

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



Matúš Kolárik

INHIBITORY TYROSINKINAS, PROTI NÁDOROVÝCH LÉČIV NOVÉ GENERACE
MODULUJÍ METABOLISMUS ELLIPTICINU

Inhibitors of tyrosine kinases the anticancer drugs of a new generation modulate
metabolism of ellipticine

Bakalářská práce

Vedoucí práce: prof. RNDr. Marie Stiborová, DrSc.

Praha, 2019

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracoval samostatně pod vedením školitelky prof. RNDr. Marie Stiborové, DrSc. a všechny použité prameny jsem řádně citoval.

V Praze dne:

Podpis:

Poděkování:

Rád bych se touto cestou poděkoval své školitelce prof. RNDr. Marii Stiborové, DrSc. za přidělení zajímavé práce, profesionální přístup, velkou vstřícnost, trpělivost, cenné rady, všechen investovaný čas a ochotu pomoci ve všech fázích vypracovávání předkládané práce. Velké poděkování patří kolektivu laboratoře 221 za vytvoření příjemného pracovního prostředí a svým rodičům za podporu, kterou mně po celou dobu poskytovali.

Práce byla finančně podporována grantem: „Komplexní pohled na mechanismus působení a metabolismus inhibitorů tyrosinkinas a studium přístupů k potenciaci jejich protinádorové účinnosti“ (GAČR: 18 – 10251S)

Abstrakt

Ellipticin je cytotoxický alkaloid, který působí několika mechanismy účinku. Interkaluje se do DNA, inhibuje topoisomerasu II a aktivuje apoptózu svým vlivem na protein p53. Hlavním mechanismem účinku je tvorba kovaletních aduktů aktivačních metabolitů ellipticinu s DNA. Inhibitory tyrosinkinas vandetanib, lenvatinib a cabozantinib, jsou onkofarmaka, schválená k terapii pokročilých a metastázujících nádorů štítné žlázy. Mechanismem jejich účinku je ovlivnění buněčné signalizace v nádorové buňce.

Předkládaná bakalářská práce se zabývala studiem vlivu inhibitorů tyrosinkinas na metabolismus ellipticinu *in vitro*, jelikož metabolická aktivace ellipticinu určuje jeho farmakologický účinek. Zkoumán byl vliv inhibitorů tyrosinkinas na tvorbu všech metabolitů, aktivačních i detoxifikačních, katalyzovaných jaterními mikrosomy člověka a potkana. Dále byl studován vliv inhibitorů tyrosinkinas na oxidaci ellipticinu rekombinantními cytochromy P450 (CYP) člověka a potkana v Supersomech™. Vliv testovaných inhibitorů byl sledován i na oxidaci ellipticinu peroxidasami, včetně thyreoperoxidasy. Metabolity ellipticinu byly separovány pomocí vysoko účinné kapalinové chromatografie (HPLC).

Testované inhibitory tyrosinkinas inhibují oxidaci ellipticinu enzymovými systémy lidských i potkaních mikrosomů. Oxidace ellipticinu cytochromy P450 1A1 a 1A2 člověka a potkana nebyla inhibitory tyrosinkinas inhibována. Nejvýraznější inhibiční účinek inhibitorů tyrosinkinas byl pozorován na tvorbu N^2 -oxidu ellipticinu, katalyzovanou CYP2D6, která je unikátní pouze pro ellipticin k inhibici oxidace „markerového“ substrátu CYP2D6, bufuralolu, nedocházelo. Dále byla pozorována inhibice oxidace ellipticinu i „markerových“ substrátů CYP3A4, 6 β -hydroxylace testosteronu, a CYP2C9, 4'-hydroxylace diklofenaku. Metabolismus ellipticinu katalyzovaný peroxidasami nebyl inhibitory tyrosinkinas ovlivněn. Bylo zjištěno, že ellipticin je oxidován thyreoperoxidasou, což je unikátní výsledek. Oxidace xenobiotik (včetně ellipticinu) tímto enzymem nebyla totiž doposud popsána.

Získané výsledky naznačují, že inhibitory tyrosinkinas podané společně s ellipticinem mohou vést ke snížení farmakologické účinnosti tohoto léčiva.

Klíčová slova: ellipticin, inhibitory tyrosinkinas, cytochromy P450, peroxidasy, thyreoperoxidasa, aktivační metabolity, farmakologická účinnost, protinádorové léky

Abstract

Ellipticine is a cytotoxic alkaloid that exhibits multiple mechanisms of action such as intercalation into DNA, inhibition of topoisomerase II and activation of apoptosis due to changes in protein p53. The main mechanism of its action is formation of covalent adducts of ellipticine metabolites with DNA. Inhibitors of tyrosine kinases vandetanib, lenvatinib and cabozantinib are anticancer drugs, approved for treatment of advanced metastatic thyroid gland cancer. Mechanism of their action is modulation of cell signalization pathways in cancer cells.

The aim of this thesis was investigation whether tyrosine kinase inhibitors can modulate metabolism of ellipticine *in vitro*, because metabolic activation of ellipticine dictates its pharmacological efficacy. The formation of ellipticine metabolites catalyzed by human and rat microsomes was found. SupersomesTM containing human or rat recombinant cytochromes P450 (CYP) were used to resolve, whether tyrosine kinase inhibitors affect oxidation of ellipticine by these enzymes. Other enzymes tested for possible alteration of formation of metabolites of ellipticine were peroxidases, including thyreoperoxidase. Ellipticine metabolites were separated by HPLC and quantified.

Oxidation of ellipticine by human or rat microsomal enzyme systems was inhibited by tested tyrosine kinase inhibitors, however these inhibitors had no effect on oxidation of ellipticine catalyzed by human or rat CYP1A1 and CYP1A2. The most prominent inhibition effect of tested inhibitors was inhibition of *N*²-oxidation of ellipticine mediated by CYP2D6. This is considered to be a unique phenomenon for ellipticine, because oxidation of a „marker“ substrate of CYP2D6, bufuralol, was not altered. Tyrosine kinase inhibitors caused the inhibition of not only the oxidation of ellipticine by CYP3A4 and CYP2C9, but also their „marker“ substrates. Peroxidase mediated metabolism of ellipticine was essentially not modulated by tested compounds. We found that thyreoperoxidase oxidizes ellipticine, which is a unique result, because metabolism of xenobiotics (including ellipticine) by thyreoperoxidase has not still been found.

The results indicate that pharmacological efficacy of ellipticine might be decreased by tyrosine kinase inhibitors.

Key words: ellipticine, tyrosine kinase inhibitors, cytochromes P450, peroxidases, thyreoperoxidase, activation metabolites, pharmacological efficacy, anti-cancer drugs

Obsah

Seznam použitých zkratk a značek	8
1. Teoretický úvod	9
1.1. Biotransformace látek.....	9
1.1.1. Cytochromy P450.....	9
1.1.1.1. Reakční cyklus cytochromů P450	10
1.1.1.2. Lokalizace v organismu a nomenklatura cytochromů P450	11
1.1.1.3. Cytochromy P450 podrodiny 1A	12
1.1.1.4. Cytochromy P450 podrodiny 2C.....	12
1.1.1.5. Cytochromy P450 podrodiny 2D	13
1.1.1.6. Cytochromy P450 podrodiny 3A	13
1.1.2. Peroxidasy	14
1.1.2.1. Reakční cyklus peroxidasy	15
1.2. Ellipticin	17
1.2.1. Metabolismus ellipticinu	18
1.3. Vandetanib.....	20
1.3.1. Metabolismus vandetanibu.....	20
1.4. Lenvatinib.....	21
1.4.1. Metabolismus lenvatinibu	22
1.5. Cabozantinib.....	23
1.5.1. Metabolismus cabozantinibu	24
2. Cíle práce	25
3. Materiál a metody	26
3.1. Použité chemikálie	26
3.2. Použité přístroje.....	28
3.3. Použité metody	29
3.3.1. Oxidace ellipticinu jaterními mikrosomy člověka a potkana	29
3.3.1.1. Oxidace ellipticinu rekombinantními cytochromy P450 v Supersomech™.....	30
3.3.1.2. Separace produktů oxidace ellipticinu cytochromy P450	30
3.3.2. Stanovení aktivity CYP2C9 sledováním 4'-hydroxylace diklofenaku	30
3.3.2.1. Separace metabolitů diklofenaku	31

3.3.3. Stanovení aktivity CYP2D6 sledováním 1'-hydroxylace bufuralolu.....	32
3.3.3.1. Separace metabolitů bufuralolu	33
3.3.4. Stanovení aktivity CYP3A4 sledováním 6β-hydroxylace testosteronu	33
3.3.4.1. Separace metabolitů testosteronu.....	35
3.3.5. Oxidace ellipticinu peroxidasami	35
3.3.5.1. Oxidace ellipticinu ovčí cyklooxygenasou 1	36
3.3.5.2. Oxidace ellipticinu lidskou thyreoperoxidasou	36
3.3.5.3. Separace produktů oxidace ellipticinu peroxidasami	37
3.3.6. Analýza dat.....	37
4. Výsledky	38
4.1. Vliv vandetanibu, lenvatinibu a cabozantinibu na oxidaci ellipticinu jaterními mikrosomy člověka a potkana	38
4.2. Vliv vandetanibu, lenvatinibu a cabozantinibu na oxidaci ellipticinu cytochromy P450 člověka a potkana	41
4.3. Vliv vandetanibu, lenvatinibu a cabozantinibu na aktivitu cytochromů P450 2C9, 2D6 a 3A4	51
4.4. Vliv vandetanibu, lenvatinibu a cabozantinibu na oxidaci ellipticinu křenovou peroxidasou, laktoperoxidasou, myeloperoxidasou a cyklooxygenasou-1	54
4.5. Vliv vandetanibu, lenvatinibu a cabozantinibu na oxidaci ellipticinu thyreoperoxidasou	59
5. Diskuze	61
6. Závěr	64
7. Použitá literatura	65

Seznam použitých zkratk a značek

CYP – cytochrom P450

DMSO - dimethylsulfoxid

DNA – deoxyribonukleová kyselina

EGFR – receptor epidermálního růstového faktoru

HPLC – vysoko účinná kapalinová chromatografie

NADPH – nikotinamidadeninukletidfosfát v redukované formě

PDGFR - receptor růstového faktoru krevních destiček

VEGFR – receptor růstového faktoru cévního endotelu

1. Teoretický úvod:

1.1. Biotransformace látek

Biotransformace je pojem označující procesy, které by měly docílit vyloučení cizorodých látek (xenobiotik) z organismu nebo potlačit jejich působení na organismus. Metabolismus xenobiotika může vést ke snížení jeho toxicity tvorbou detoxifikačních metabolitů. Biotransformací na druhou stranu mohou vznikat i sloučeniny, které jsou toxičtější, než byla parentální molekula. Tehdy se jedná o aktivaci xenobiotika, nebo-li tvorba aktivačních metabolitů [Stiborová a kol. 2004 a]. Aktivace xenobiotik může mít např. za následek, že z nemutagenní sloučeniny vznikne mutagenní sloučenina. V některých případech je aktivace sloučenin naopak žádoucím dějem. Příkladem je aktivace pro-léčiv na aktivní formy léčiv [Stiborová a kol. 1999].

V případě xenobiotik, která patří mezi hydrofobní organické sloučeniny je biotransformace cílena na snížení jejich lipofilicity, a tím i její snazší vyloučení z organismu. Proces biotransformace se dělí na dvě fáze [Coleman 2010]:

1. Derivatizační fáze. Cílem první fáze biotransformace je zavést nebo odkrýt ve struktuře xenobiotika hydrofilní skupiny. Reakce typické pro tuto fázi jsou např. reakce oxidační, jako například hydroxylace a dealkylace. Dále se může jednat o redukční reakce nebo hydrolytické reakce.
2. Konjugační fáze. Tato fáze je cílena na další zvýšení hydrofilnosti metabolitů, které vznikly v derivatizační fázi biotransformace. Typickými reakcemi je konjugace s kyselinou glukuronovou, glutathionem, aminokyselinami, sulfatace, methylace nebo acetylace.

Enzymy participující na první fázi biotransformace xenobiotik jsou hlavně cytochromy P450 a peroxidasy.

1.1.1. Cytochromy P450

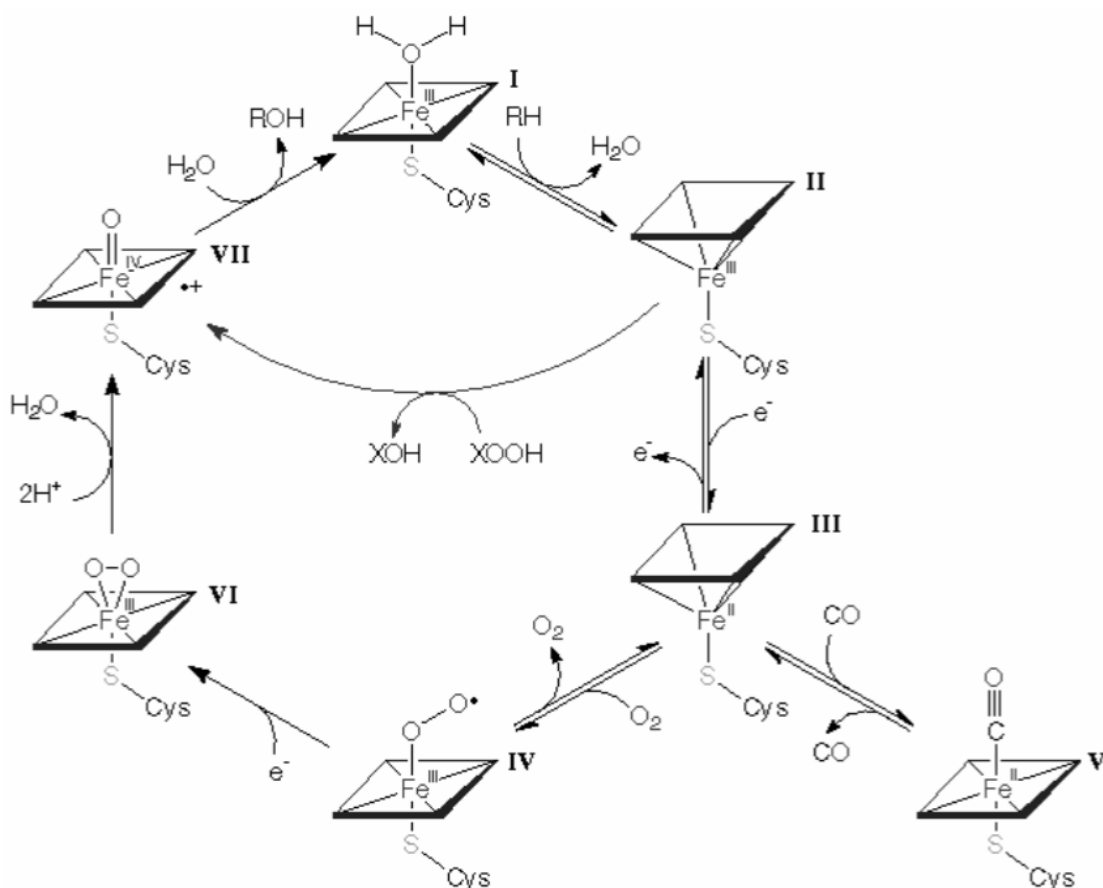
Cytochromy P450 jsou velkou „super rodinou“ hemoproteinů, která hraje značnou roli v metabolismu cizorodých látek, xenobiotik, ale i některých eobiotik, v organismu. [Skálová a kol. 2011]. Od jiných hemoproteinů se odlišují výjimečným chováním, které je dáno jejich strukturou. V aktivním centru cytochromů P450 se nachází protoporfyrin IX,

který je vázán thiolátovou vazbou sulfhydrylové skupiny cysteinu v aktivním centru a zároveň hydrofobními interakcemi [Stiborová a kol. 2004 a].

Název cytochrom P450 vznikl na základě skutečnosti, že v redukovaném stavu dochází vazbou molekuly oxidu uhelnatého na hem v proteinu tohoto enzymu ke vzniku charakteristického absorpčního pásu při 450 nm [Omura & Sato 1964]. Struktura hemu v aktivním místě s navázanou molekulou oxidu uhelnatého je uvedena na obrázku 1 (reakce V) na straně 11.

1.1.1.1. Reakční cyklus cytochromů P450

Schéma reakčního cyklu cytochromu P450 je uvedeno na obrázku 1 na straně 11. Prvním krokem reakčního cyklu je vytěsnění molekuly vody z aktivního centra vstupem substrátu, čímž dochází ke změně koordinačního stavu atomu železa z hexakoordinovaného na pentakoordinované. Hemový kruh a ion železa už nejsou v jedné rovině. Následná redukce trojmocného ionu železa na dvoumocný je umožněna elektronem, který byl dodán z NADPH prostřednictvím NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasy. V redukované formě ion železa naváže molekulu kyslíku za vzniku ferrisuperoxidového komplexu (IV) (Obr. 1 na straně 11.) Další redukcí dochází k tvorbě peroxidového anionu. Elektrony pro redukci poskytuje NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasy nebo NADH:cytochrom *b₅* oxidoreduktasa. Vazba mezi atomy kyslíku je štěpena, jeden atom kyslíku je redukován na vodu a druhý je stále vázaný na ion železa ve ferrioxenovém komplexu (Obr. 1 na straně 11) reakce VII, tzv. sloučenina I. Takto vzniká kyslíkový radikál, který je schopný vytrhnout atom vodíku ze substrátu. Tím vznikne hydroxylový radikál a radikál substrátu, které rekombinací vytvoří hydroxyderivát substrátu a molekula enzymu se vrací do klidového stavu [Stiborová a kol. 2004 a].



Obrázek 1 Schéma reakčního cyklu cytochromu P450. Aktivní místo klidového enzymu (I). Vytěsnění vody substrátem a změna konformace aktivního místa (II). Redukce atomu železa z oxidačního čísla III na II (III). Tvorba komplexu enzymu s CO s charakteristickým absorpčním maximem při 450 nm (V). Vznik ferrisuperoxidového komplexu (IV). Aktivace kyslíku na peroxidový anion (VI). Vznik ferrioxenového komplexu (VII). Oxidací substrátu a vytěsněním oxidovaného produktu vodou se cytochrom P450 vrací do klidového stavu (I). Převzato z publikace Stiborová a kol. 2004a

1.1.1.2. Lokalizace cytochromů P450 v organismu a jejich nomenklatura

Cytochromy P450 jsou v buňkách lokalizované zejména v membránách hladkého endoplasmatického retikula a mitochondrií. V lidském těle se CYP vyskytují hlavně v játrech a v menší, i když stále ve významné míře i v plicích, ledvinách, kůži, tenkém střevě, mozku a nadledvinách. [Stiborová a kol. 1999].

Cytochromy P450 se dělí podle stupně shodnosti aminokyselinové sekvence. Pokud je vyšší než 40 %, jedná se o rodinu, což se označuje první číslicí za zkratkou CYP. Při homologii aminokyselinové sekvence vyšší než 55 % se pak zařazují do podrodin, které se

označují písmenem. Poslední číslo přináleží dané isoformě konkrétního cytochromu P450 [Rendic & Di Carlo 1997]. Jako příklad je možno uvést cytochrom P450 1A1 (CYP1A1).

1.1.1.3. Cytochromy P450 podrodiny 1A

Lidské cytochromy P450 rodiny 1 jsou zodpovědné za metabolickou aktivaci mnoha sloučenin včetně toxinů, kontaminantů životního prostředí i léčiv například: polycyklických aromatických uhlovodíků, aflatoxinu B1, ellipticinu a warfarinu. CYP1A1 a 1A2 vykazují vysokou míru homologie, kolem 70 % [Rendic & Di Carlo 1997].

CYP1A1 je převážně extrahepatální enzym. Vyskytuje se v plicích, ledvinách, gastrointestinálním traktu a dalších orgánech [Rendic & Di Carlo 1997], nízké hladiny tohoto cytochromu P450 byly s rozvojem imunochemických technik zaznamenány i v jaterní tkáni člověka [Stiborová a kol. 2005].

Cytochrom P450 1A2 je specificky jaterní enzym vykazuje interindividální rozdíly v zastoupení v játrech jednotlivých jedinců. Rozdíly v jeho schopnosti metabolicky aktivovat prekarcinogenní látky jsou připisovány vyskytu nádorů močového měchýře a tlustého střeva [Rendic & Di Carlo 1997].

1.1.1.4. Cytochromy P450 podrodiny 2C

Cytochromy P450, kteří jsou členy této podrodiny, vykazují 80 % homologii jejich proteinů. V organismu člověka je to nejkompexnější skupina cytochromů P450. Jejich substrátové specifity se překrývají. V játrech je v největší míře zastoupen CYP2C9, kromě něho jsou přítomny i CYP2C8, 2C18 a 2C19 [Rendic & Di Carlo 1997].

Enzymy této podrodiny hrají klíčovou roli v metabolismu mnoha klinicky významných léčiv jako nesteroidního protizánětlivého léčiva diklofenaku, antiepileptika fenytoinu, léčiv ze skupiny benzodiazepinů a mnoha dalších, včetně antivirotických a neurologických léků [Rendic & Di Carlo 1997].

1.1.1.5. Cytochromy P450 podrodiny 2D

V lidském organismu je exprimován pouze cytochrom P450 2D6. CYP2D6 je známý svým značným polymorfismem, který má za následek, že někteří jedinci jsou tzv. „rychlí“ metabolisátoři např. černošská populace. Na opačné straně stojí Kavkazská populace, kde převážná část jedinců patří mezi ty, kteří špatně přeměňují substráty tohoto enzymu [Rendic & Di Carlo 1997].

Mezi substráty tohoto enzymu patří opioidní látky např. kodein a dextromethorfan, antidepresiva např. citalopram a paroxetin, antiarytmika např. propafenon a β -blokátory např. bufuralol. Enzymový polymorfismus má v tomto případě značný dopad na farmakologickou účinnost léčiv [Rendic & Di Carlo 1997].

1.1.1.6. Cytochromy P450 podrodiny 3A

Podrodina cytochromů P450 3A je nejvíce zastoupená ze všech cytochromů P450 v játrech člověka. CYP3A4 a 3A5 jsou exprimovány i extrahepatálně, v orgánech trávicího traktu, plicích a ledvinách. CYP3A7 je převážně obsažen v tkáni fetálních jater, u dospělých se vyskytuje ve výrazně nižším množství [Rendic & Di Carlo 1997].

Cytochrom P450 3A4 je enzymem který se podílí na metabolismu široké škály léčiv používaných v medicíně. Přibližně 50 % léčiv je přeměňováno tímto enzymem [Skálová a kol. 2011]. Metabolisuje i endogenní substráty jako steroidní hormony např.: kortizol, estradiol a testosteron. U reakcí steroidních látek se projevuje značná regiosektivita reakcí [Rendic & Di Carlo 1997].

Aktivita tohoto enzymu je často ovlivněna léky, zejména v kombinacích mohou působit jako kompetitivní inhibitory. Flavonoidy a jiné složky stravy mají vliv na CYP3A4, např. látky obsažené v grapefruitech [Rendic & Di Carlo 1997].

1.1.2. Peroxidas

Peroxidas patří do skupiny hemoproteinů, kde molekula hemu (protoporfyrinu IX s koordinovaným atomem železa) je vázaná přes histidylový zbytek v aktivním místě. Některé peroxidas mají modifikovanou molekulu hemu nebo ji i nemusí obsahovat. Peroxidas jsou často glykosylovány [Stiborová a kol. 2000].

Peroxidas jsou široce zastoupené, zejména v rostlinách a nižších houbách, v menší míře i v buňkách mikroorganismů a živočišných tkáních. Detoxifikují peroxid vodíku. Substrátová specifita peroxidas je široká, fenoly a aromatické aminy jsou považovány za jejich nejlepší substráty, avšak substráty peroxidas jsou i další organické a anorganické sloučeniny [Stiborová a kol. 2004 a].

Z křenu *Armoratia rusticana* byla izolována křenová peroxidas. Tato peroxidas se vyskytuje ve více isoformách, nejvíce zastoupena je peroxidas typu C. V rostlinách zastává mnohé fyziologické funkce, např. tvorbu suberinu a ligninu a metabolismus kyseliny indolyl-3-octové, která funguje jako fytohormon [Veitch 2004].

Křenová peroxidas typu C má ve svojí struktuře kromě hemu i dva atomy vápníku. Sacharidy tvoří asi 18 % hmotnosti enzymu. Reakcemi katalyzovanými křenovou peroxidasou vznikají radikály substrátu za současné redukce peroxidu vodíku na vodu [Veitch 2004]. Křenová peroxidas dokáže oxidovat i cizorodé látky, včetně kontaminantů životního prostředí, například *o*-anisidin [Stiborová a kol. 2002].

Laktoperoxidasa byla, jak název napovídá, izolována z mléka. Struktura proteinu je tvořena jedním řetězcem aminokyselin. Míra glykosylace je kolem 10 % hmotnosti proteinu. V aktivním centru enzymu je vázán hem a vápenatý kation. Fyziologickou funkcí laktoperoxidas je antimikrobiální účinek v mléce a ochrana buněk před peroxidem vodíku [Kussendrager & van Hooijdonk 2000]. Laktoperoxidas dokáže aktivovat i mutagenní a karcinogenní látky, například 3-aminobenzanthron [Arlt a kol. 2004]

Myeloperoxidas je enzymem vyskytujícím se v monocytech a neutrofilech. Enzym je silně glykosylován, obsahuje hem v reakčním centru a tvoří dimery spojené disulfidovým můstkem. Fyziologickou funkcí myeloperoxidas je ochrana organismu, neutrofily ji využívají ke zneškodnění patogenů v těle. Oxiduje chloridy za redukce peroxidu vodíku

nebo superoxidového anionu na kyselinu chloristou a vodu [Arnold 2004]. Myeloperoxidasa dokáže oxidovat i léčiva jako je např. ellipticin [Poljaková a kol. 2005].

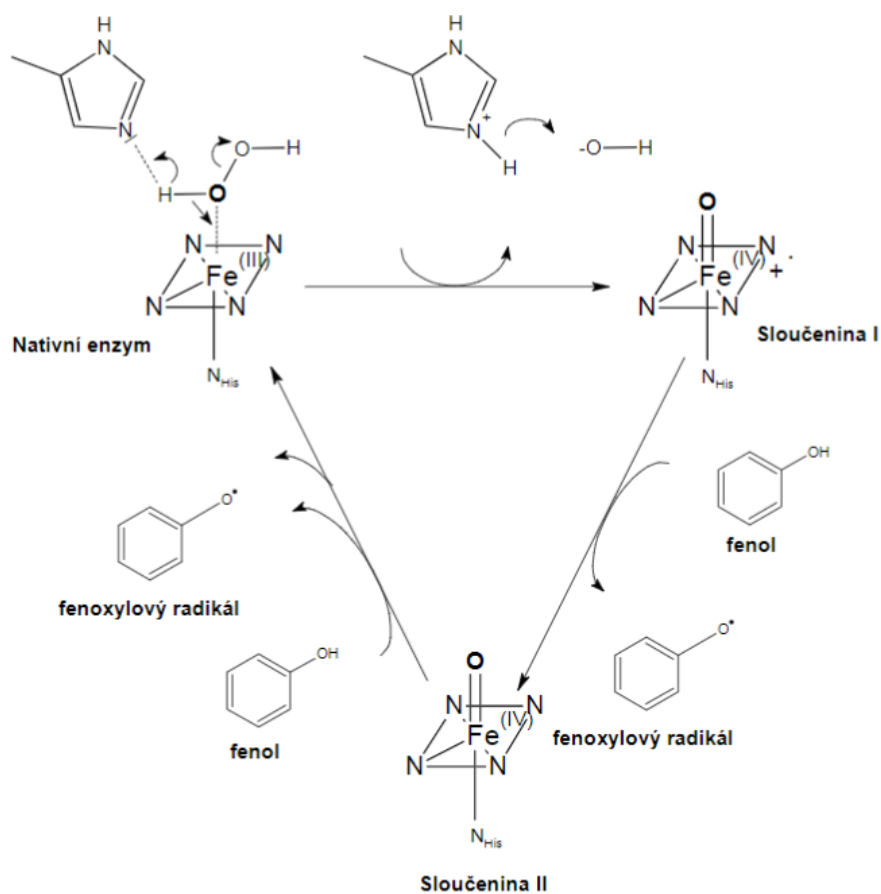
Cyklooxygenasa 1 (nebo i prostaglandin H synthasa) je membránová peroxidasa exprimována prakticky ve všech lidských tkáních. Hlavními reakcemi je tvorba prostaglandinů oxidací kyseliny arachidonové. Prostaglandiny se podílejí na regulaci široké škály procesů, včetně zánětu a tvorby cév [Morita 2002]. Cyklooxygenasa se dokáže účastnit i metabolismu xenobiotik [Stiborová a kol. 2002] [Poljaková a kol. 2005].

Thyreoperoxidasa je membránový glykosylovaný hemoprotein exprimovaný ve štítné žláze. Hlavní funkcí thyreoperoxidasy je katalýza reakcí syntézy thyroidních hormonů, thyroxinu a trijodothyroninu. Podílí se na tvorbě jodu, jodaci a „caplingu“ tyrosylových zbytků na thyreoglobulinu ve folikulu štítné žlázy [Taurog a kol. 1996]. Doposud nebylo jasně dokázáno, zda thyreoperoxidasa je schopná oxidovat i xenobiotika.

1.1.2.1. Reakční cyklus peroxidasy

Reakční cyklus peroxidasy začíná vazbou peroxidu vodíku na nativní molekulu enzymu za účasti distálního histidylového zbytku. Dochází k reakci peroxidu vodíku s atomem železa hemu a vzniku sloučeniny I. Sloučenina I je nositelkou aktivovaného kyslíku, kyslík je v ní vázán jako šestý ligand hemového železa v oxidačním stupni IV. Druhým oxidačním ekvivalentem je ferriporfyrinový π -kation radikál. Sloučenina I je nestabilní a má krátkou dobu života. Se substrátem vzniká ze sloučeniny I sloučenina II. Sloučenina II reaguje s další molekulou substrátu pomaleji než sloučenina I. Reakcí sloučeniny II se substrátem je cyklus ukončen a molekula peroxidasy se opět nachází ve výchozím stavu [Stiborová a kol. 2004 a].

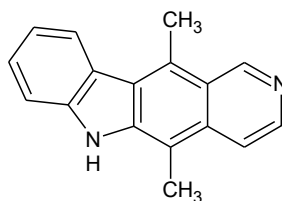
Reakce substrátu s peroxidasou probíhá jako dva jednoelektronové přenosy. Reakční cyklus peroxidasy je uveden na obrázku 2 na straně 16.



Obrázek 2 Schéma reakčního cyklu peroxidasy, kde substrátem je fenol. Převzato z publikace Stiborová a kol. 2004a

1.2. Ellipticin

Ellipticin je alkaloid, který byl izolován z rostlin čeledě *Apocynaceae*. [Goodwin a kol. 1959]. Struktura ellipticinu je uvedena na obrázku 3. Samotný ellipticin i jeho derivát 9-hydroxyellipticin vykazují účinnost proti různým nádorům jako je anaplastický karcinom štítné žlázy [Juret a kol. 1979], karcinom prsu s kostními metastázemi, či akutní leukemie [Stiborová & Frei 2014]. V posledních letech byly objeveny nové deriváty ellipticinu s karbazolovým fragmentem v struktuře, které působí *in vitro* na buňky medulárního karcinomu štítné žlázy [Kumarasami & Sun 2017].



Obrázek 3 Strukturní vzorec ellipticinu

Ellipticin má vysokou efektivitu jako protinádorové léčivo, na druhou stranu téměř nepůsobí toxicky na játra a nesnižuje krvetvorbu [Auclair 1987]. Mezi nejčastější vedlejší účinky ellipticinu patří sucho v ústech, mykotické infekce jazyka a jícnu, hypertenze a celková slabost, při dlouhodobé terapii byly pozorovány případy toxického poškození a selhání ledvin [Paoletti a kol. 1980] [Juret a kol. 1979]. Potenciálním rizikem je mutagenita a genotoxicita ellipticinu [Stiborová a kol. 2001].

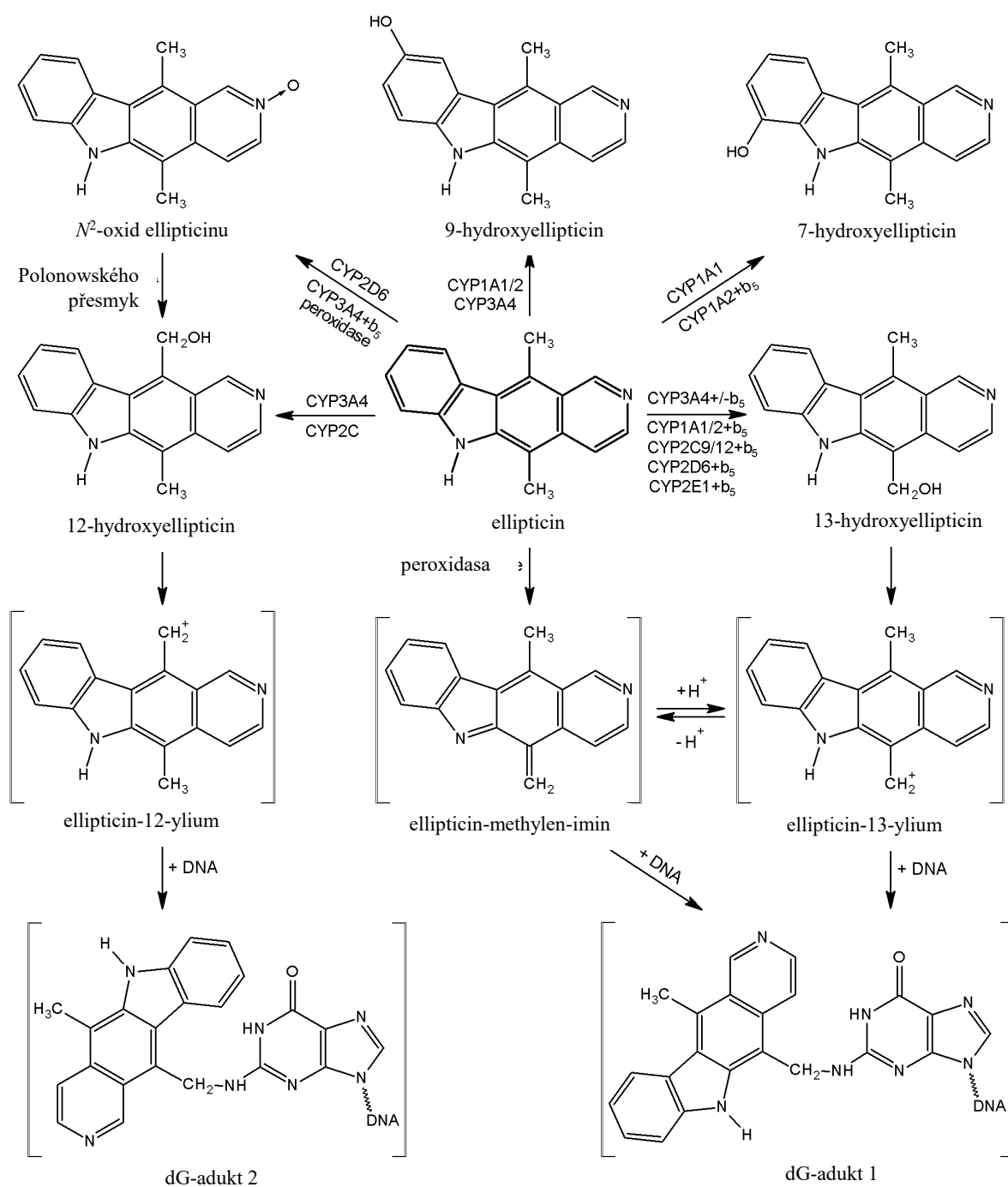
Mechanismus účinku ellipticinu zahrnuje jeho interkalaci do DNA [Singh a kol. 1994], inhibici topoisomerasy II [Monnot a kol. 1991] a tvorbu kovalentních DNA aduktů, která je závislá na metabolismu ellipticinu [Stiborová a kol. 2004 b].

Ellipticin také působí i mechanismy, které nejsou založeny na poškození DNA. V publikaci Sugikawa a jeho kolegů naznačují, že 9-hydroxyellipticin může vyvolat apoptózu, tím že obnoví funkci mutovaného proteinu p53, který se podílí na kontrole buněčného cyklu. Zároveň nebyl prokázán žádný vztah mezi tímto dějem a poškozením DNA indukovaným topoisomerasou II [Sugikawa a kol. 1994].

1.2.1. Metabolismus ellipticinu

Ellipticin je oxidačně metabolisován enzymovými systémy jaterních mikrosomů obsahujících cytochrom P450. Tyto enzymy katalyzují vznik až pěti metabolitů: 9-hydroxy-, 12-hydroxy-, 13-hydroxy-, 7-hydroxyellipticinu a N^2 -oxidu ellipticinu. 12-Hydroxyellipticin vzniká i spontánní přeměnou N^2 -oxidu ellipticinu Polonowského přesmykem [Stiborová & Frei 2014]. 12-hydroxy-, 13-hydroxyellipticin a N^2 -oxid ellipticinu jsou reaktivní aktivační metabolity, které jsou schopné disociovat na ellipticin-12-ylum a ellipticin-13-ylum. Vznik reaktivních metabolitů katalyzují zejména cytochromy P450 3A4 a 2D6. 9-hydroxy- a 7-hydroxyellipticin jsou detoxikační metabolity, jsou tvořeny především pomocí CYP1A1 a 1A2 [Stiborová a kol. 2004 b] [Stiborová a kol. 2006] [Stiborová & Frei 2014] Schéma metabolismu ellipticinu je uvedena na obrázku 4 na straně 19.

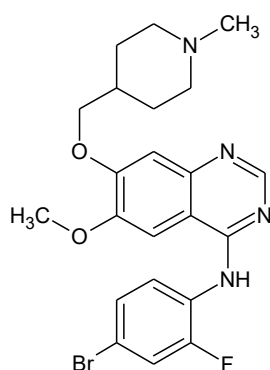
Cytochromy P450 využívají při oxidaci substrátů elektrony, které získají přenosem z NADPH prostřednictvím NADPH:cytochrom P450 oxidoredukasy, ale některé cytochromy P450 dokáží využívat i elektrony, kde je donorem elektronů cytochrom b_5 [Stiborová a kol. 2016]. Cytochrom b_5 sehrává roli v metabolismu ellipticinu, *in vitro* bylo pozorováno, že cytochrom b_5 dokáže zvyšovat efektivitu 12-hydroxylace a 13-hydroxylace ellipticinu cytochromy P450 1A1, 1A2 a 3A4, zatímco množství detoxikačních metabolitů je buďto nezměněné nebo snižené [Kotrbová a kol. 2011].



Obrázek 4 Schéma metabolismu ellipticinu cytochromy P450 a peroxidasami ukazuje metabolity ellipticinu, které již byly identifikovány a metabolity, které tvoří kovaletní DNA adukty. Převzato z publikace [Stiborová & Frei 2014]

1.3. Vandetanib

Vandetanib je léčivo patřící mezi inhibitory tyrosinkinas, používá se k terapii medulárního karcinomu štítné žlázy [Wells a kol 2012]. Od roku 2006 je schválený Evropskou lékovou agenturou pro terapii pokročilého a metastického medulárního karcinomu štítné žlázy [Herbst a kol 2007]. Struktura vandetanibu je uvedena na obrázku 5. Kromě nádorů štítné žlázy byly provedeny studie účinnosti vandetanibu proti jiným tumorům, výsledky dosažené s pacienty s nemalobuněčným karcinomem plic prokazují i tuto protinádorovou aktivitu. Na druhé straně vandetanib neměl v klinických studiích efekt na melanom, ani na karcinom prsu [Herbst a kol 2007].



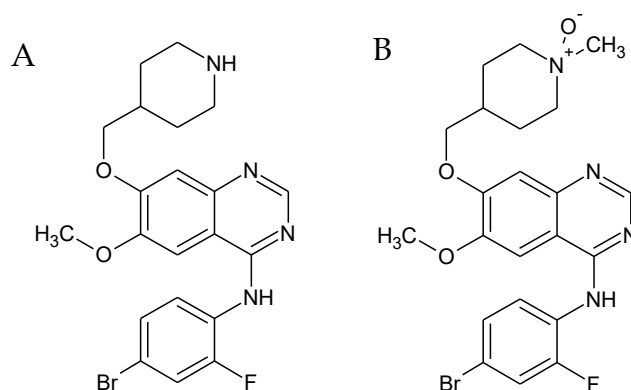
Obrázek 5 Strukturní vzorec vandetanibu

Mechanismus účinku vandetanibu spočívá v inhibici receptorových tyrosinkinas. Terapeutické cíle jsou: receptor pro růstový faktor cévního endotelu 2 (VEGFR-2), receptor pro epidermální růstový faktor (EGFR), a dalších. Inhibice těchto drah vede k zastavení tvorby cév a růstu nádoru [Gotink & Verheul 2010].

1.3.1. Metabolismus vandetanibu

Doposud publikované práce signalizují, že vandetanib je *in vitro* oxidován cytochromem P450 3A4 na *N*-desmethylvandetanib (Obr 6 A, strana 21), zatímco flavinové monooxygenasy 1 a 3 oxidují vandetanib na *N*-oxid vandetanibu (Obr 6 B, strana 21) [Martin a kol. 2011]. Metabolity byly nalezeny rovněž v tělních tekutinách a stolici zdravých dobrovolníků v průběhu farmakokinetických studií [Martin a kol. 2012].

Metabolity vandetanibu také vykazují terapeutický účinek, *N*-desmethylvandetanib dosahuje podobnou účinnost jako vandetanib, ale *N*-oxid vandetanibu je asi 50ti-násobně méně efektivní v porovnání s vandetanibem [Martin a kol. 2011]. Poznatky z literatury tedy naznačují, že metabolismus vandetanibu může hrát roli v jeho farmakologické účinnosti.

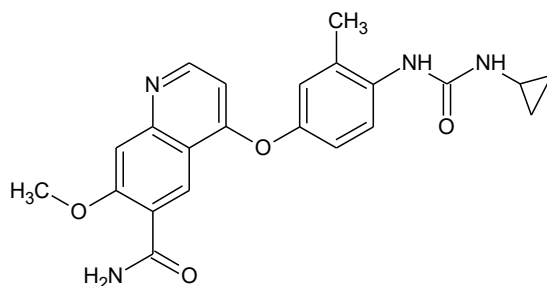


Obrázek 6 Strukturní vzorce *N*-desmethylvandetanibu (A) a *N*-oxidu vandetanibu (B)

1.4. Lenvatinib

Lenvatinib je orálně podávaný inhibitor tyrosinkinas, schválený k terapii diferencovaného tumoru štítné žlázy u pacientů, u kterých selhala léčba radioaktivním jódem [Cabanillas a kol. 2015]. V kombinaci s everolimem je též určený pro pacienty s karcinomem ledvin [Roviello a kol. 2018]. Lenvatinib byl porovnáván v klinické studii se sorafenibem, který patří mezi inhibitory tyrosinkinas používané v terapii hepatocelulárního karcinomu. Pacienti, kterým byl podáván lenvatinib přežívali déle bez progresu onemocnění v porovnání s pacienty, kterým byl podáván sorafenib [Personeni a kol. 2019].

Lenvatinib inhibuje širokou škálu receptorových tyrosinkinas jako VEGFR 1-3, receptory fibroblastového růstového faktoru (FGFR), receptory růstového faktor krevních destiček (PDGFR) a další [Hussein a kol. 2017]. Struktura lenvatinibu je uvedena na obrázku 7 na straně 22.



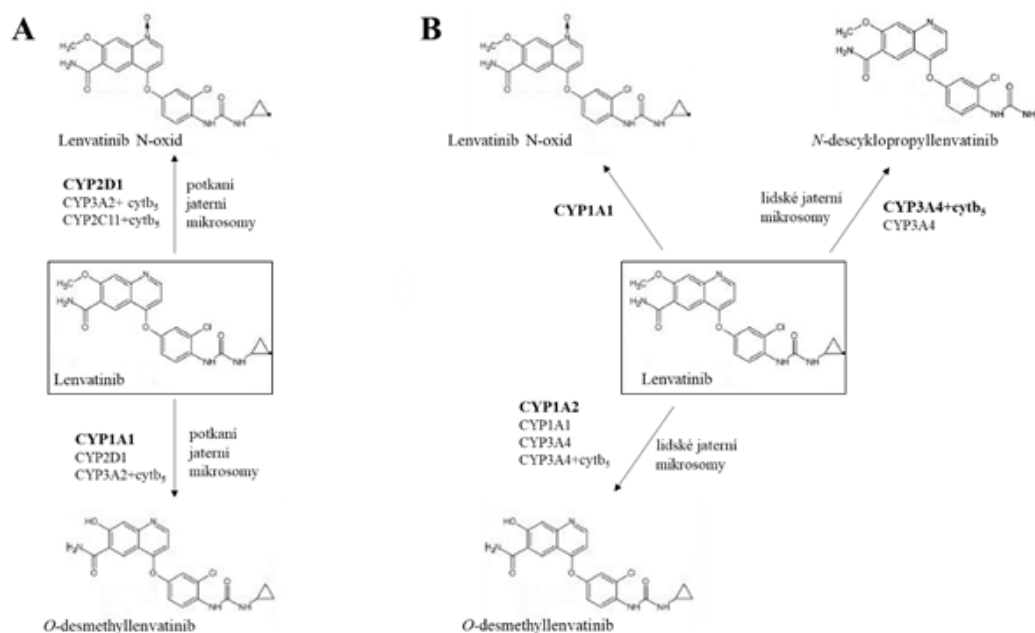
Obrázek 7 Strukturní vzorec lenvatinibu

1.4.1. Metabolismus lenvatinibu

Lenvatinib podléhá biotransformaci katalyzované cytochromy P450 a aldehyd oxidasou člověka a řady zvířecích modelů [Inoue a kol. 2014] [Vavrová 2018].

Podrobněji byl popsán metabolismus lenvatinibu katalyzovaný enzymy člověka a potkana. Lidské enzymy katalyzují tvorbu tří metabolitů lenvatinibu: *N*-desmethyllenvatinibu, *N*-descyklopropyllenvatinibu a *N*-oxidu lenvatinibu, na jejichž tvorbě se podílejí hlavně cytochromy P450 1A1, 1A2 a 3A4 (Obr. 8 B na straně 23)

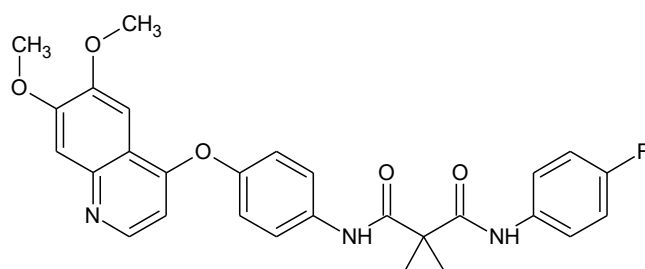
Potkaní jaterní mikrosomy a cytochromy P450 katalyzovaly vznik *N*-desmethyllenvatinibu a *N*-oxidu lenvatinibu, tvořených hlavně CYP1A1 a CYP2D1 (Obr. 8 A na straně 23)



Obrázek 8 Schéma metabolismu lenvatinibu potkaními enzymy (A) a lidskými enzymy (B)
Převzato a upraveno z práce Vavrová 2018.

1.5. Cabozantinib

Dalším členem skupiny inhibitorů tyrosinkinas je cabozantinib. Cabozantinib inhibuje široké spektrum tyrosinkinas, včetně těch cílících na VEGFR-2 [Yakes a kol. 2011]. Strukturní vzorec cabozantinibu je na obrázku 9.



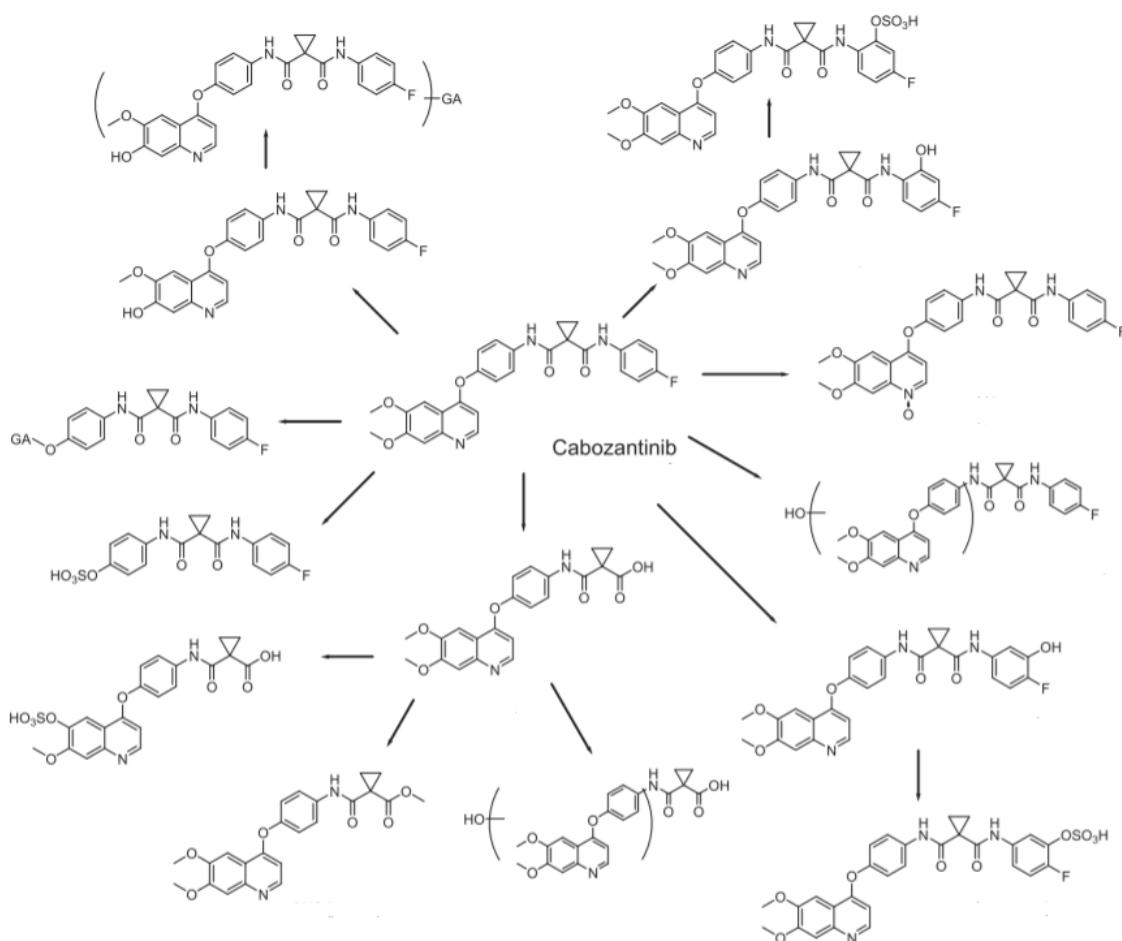
Obrázek 9 Strukturní vzorec cabozantinibu

V současné době je cabozantinib schválen k terapii lokálně pokročilého nebo metastázujícího medulárního karcinomu štítné žlázy [Fallahi a kol. 2015], a karcinomu ledvin

[Abdelaziz & Vaishampayan 2017]. Výsledky klinických studií zkoumajících efektivitu cabozantinibu proti diferencovanému karcinomu štítné žlázy také signalizují terapeutický přínos cabozantinibu [Fallahi a kol. 2015]. Cabozantinib je účinný v léčbě pacientů s hepatocelulárním karcinomem [Deeks 2019]

1.5.1. Metabolismus cabozantinibu

Cabozantinib v lidském těle podléhá přeměně na širokou paletu metabolitů, které jsou uvedeny na obrázku 10. Metabolity byly detekovány v moči, plasmě a stolici zdravých osob. [Lacy a kol. 2015]. V literatuře však chybí informace o tom, jaké enzymy katalyzují vznik uvedených metabolitů, což je v současné době předmětem studia v naší laboratoři.



Obrázek 10 Schéma metabolismu cabozantinibu v lidském tele. Převzato a upraveno z publikace Lacy a kol. 2015. (GA značí zbytek kyseliny glukuronové)

2. Cíle práce:

Cílem předkládané bakalářské práce je poznání vlivu inhibitorů tyrosinkinas vandetanibu, lenvatinibu a cabozantinibu na oxidaci ellipticinu cytochromy P450 a peroxidasami

Hlavní úkoly práce jsou následující:

- ❖ Poznání vlivu vandetanibu, lenvatinibu a cabozantinibu na oxidaci ellipticinu jaterními mikrosomy člověka a potkana
- ❖ Poznání vlivu vandetanibu, lenvatinibu a cabozantinibu na oxidaci ellipticinu rekombinantními cytochromy P450 1A1 a 1A2 člověka a potkana, CYP2C9, CYP2D6 a CYP3A4 člověka a CYP2D1 a CYP3A1 potkana
- ❖ Poznání, zda vandetanib, lenvatinib a cabozantinib ovlivňují oxidaci substrátů enzymů CYP2C9, CYP2D6 a CYP3A4
- ❖ Poznání vlivu vandetanibu, lenvatinibu a cabozantinibu na oxidaci ellipticinu peroxidasami

3. Materiál a metody:

3.1. Použité chemikálie:

1'-hydroxybufuralol, sůl kyseliny maleinové	Santa Cruz Biotechnology, USA
4'-hydroxydiklofenak	Sigma-Aldrich, USA
6 β -hydroxytestosteron	Sigma-Aldrich, USA
Acetonitril pro HPLC	VWR Chemicals, USA
Bufuralol, sůl kyseliny chlorovodíkové	Santa Cruz Biotechnology, USA
Cabozantinib	LC Laboratories, USA
Cyklooxygenasa 1	Sigma-Aldrich, USA
Diklofenak, sodná sůl	Sigma-Aldrich, USA
Dimethylsulfoxid	Lach:Ner, ČR
Dihydrogenfosforečnan draselný	Lach:Ner, ČR
Ellipticin	Sigma-Aldrich, USA
Ethylacetát	Lach:Ner, ČR
Hematin	Santa Cruz Biotechnology, USA
Heptansulfonát sodný	Sigma-Aldrich, USA
Hydroxid draselný	Penta, ČR
Chloristan sodný	Lach:Ner, ČR
Jaterní mikrosomy mužů (směs mikrosomů různých dárců)	Corning, USA
Křenová peroxidasa typu VI	Sigma-Aldrich, USA
Kyselina chloristá 68%	Lach:Ner, ČR

Kyselina octová 99%	Lach:Ner, ČR
Laktoperoxidasa	Sigma-Aldrich, USA
Lenvatinib	LC Laboratories, USA
Methanol pro HPLC	VWR Chemicals, USA
Myeloperoxidasa	Sigma-Aldrich, USA
NADPH, sodná sůl	Roche, Švýcarsko
Octan amonný	Penta, ČR
Peroxid vodíku	Lach:Ner, ČR
Supersomy TM obsahující lidský CYP1A1, CYP1A2, CYP2C9 s cytochromem <i>b</i> ₅ , CYP2D6, CYP3A4 s nebo bez cytochromu <i>b</i> ₅	Corning, USA
Supersomy TM obsahující potkaní CYP1A1, CYP1A2, CYP2D1, CYP3A1 s cytochromem <i>b</i> ₅	Corning, USA
Tekutý dusík	Linde, ČR
Testosteron	Sigma-Aldrich, USA
Thyreoperoxidasa	Antibodies OnLine, Německo
Vandetanib	LC Laboratories, USA

3.2. Použité přístroje:

Automatické pipety Research plus	Eppendorf, Německo
Inkubátor Thermomixer Compact	Eppendorf, Německo
Centrifuga Centrifuge 5418	Eppendorf, Německo
pH meter HI2211	Hanna Instruments, USA
Analytická váha Discovery	Ohaus, Švýcarsko
Evaporační centrifuga Centri Vap Concentrator	Labconco, USA
Vortex mixer	Labnet, USA
HPLC DIONEX Ultimate 3000 složená z:	
Čerpadla RS Pump	
Podavače vzorků RS Autosampler	
Termostatu pro kolonu RS Column Compartment	
UV/VIS detektoru RS Diode Array Detector	
Detektoru fluorescence RS Fluorescence Detector	ThermoScientific, USA
Filtrační systém Durapore 0,22 µm	Millipore, USA
Filtrační systém Express plus 0,22 µm	Millipore, USA
Kolona ULTRASPHERE, ODS, C18, 5 µm, 4,6 × 250 mm	Beckmann Coulter, USA
Kolona Nucleosil 100-5, C18, 5 µm, 4 × 250 mm	Macherey Nagel, Německo

3.3. Použité metody:

3.3.1. Oxidace ellipticinu jaterními mikrosomy člověka a potkana

Oxidace ellipticinu mikrosomy byla analyzována podle postupu popsaného dříve [Stiborová a kol. 2004 b]. Jaterní mikrosomy ze samců potkana kmene Wistar byly připraveny podle práce [Stiborová a kol. 2001]. Složení reakční směsi o celkovém objemu 500 μ l bylo následující:

- 100 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ pufr pH = 7,4
- 50 μ M ellipticin
- 50 μ M vandetanib resp. lenvatinib resp. cabozantinib
- jaterní mikrosomy (0,5 mg/ml proteinu)
- 1 mM NADPH

Reakční směsi byly připraveny smícháním pufru s mikrosomy a následně přidáním roztoků ellipticinu, popřípadě testovaných látek. Kontrolní inkubační směsi byly připraveny bez zkoumaných látek, které byly nahrazeny dimethylsulfoxidem (DMSO) nebo bez NADPH nebo bez mikrosomů. Reakce byla iniciována přidávkem roztoku NADPH. Inkubace probíhala 20 minut při teplotě 37°C a třepání při 450 RPM v inkubátoru Thermomixer compact. Reakce byla ukončena přidáním 1 ml ethylacetátu a směs byla následně promíchána. Do směsi bylo přidáno 5 μ l 1 mM fenacetinu v methanolu, který byl použit jako interní standard. Směs byla třepána 2 minuty při 1400 RPM v Thermomixeru Compact a centrifugována 5 minut při 15000 \times g v centrifuze Centrifuge 5418. Horní, organická fáze byla odebrána a extrakce byla provedena ještě jedenkrát podle výše uvedeného postupu. Spojené organické fáze byly odpařeny za sníženého tlaku v evaporační centrifuze Centri Vap Concentrator. Odparky byly až do analýzy uskladněny ve tmě při teplotě -20°C.

Tabulka 1 Koncentrace proteinu v jaterních mikrosomech a čísla „šarží“ použitých komerčních mikrosomů

Specifikace mikrosomů	Koncentrace proteinu v mikrosomech (mg/ml)	Číslo šarže
Potkaní	36,53	---
Mužské	20,00	3043885
Ženské	20,00	07407

3.3.1.1. Oxidace ellipticinu rekombinantními cytochromy P450 v Supersomech™

Složení reakční směsi o celkovém objemu 500 µl bylo následující:

- 100 mM KH₂PO₄/K₂HPO₄ pufr pH = 7,4
- 50 µM ellipticin
- 50 µM vandetanib resp. lenvatinib resp. cabozantinib
- 50 pmol rekombinantní cytochrom P450 člověka nebo potkana v Supersomech™
- 1 mM NADPH

Reakční směsi byly připraveny analogickým způsobem jako v části 3.3.1.

3.3.1.2. Separace produktů oxidace ellipticinu cytochromy P450

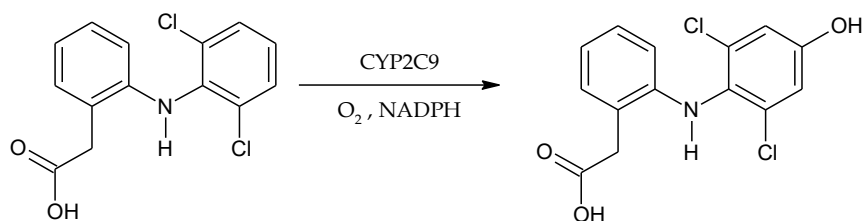
Oxidační produkty ellipticinu byly separovány pomocí vysoko účinné kapalinové chromatografie.

Separace probíhala za použití kolony ULTRASPHERE ODS Beckman, o rozměrech 250 × 4,6 mm, naplněné oktadecylovaným oxidem křemičitým o velikosti zrn 5 µm. Mobilní fáze sestávala z 64 % methanolu pro HPLC a 36 % ultra čisté vody, obsahující 5 mM heptansulfonát sodný a 32 mM kyselinu octovou.

Odparky získané z extraktů inkubačních směsí připravených postupem popsáním v kapitolách 3.3.1. a 3.3.1.1. se rozpustily v 50 µl methanolu. „Nástřik“ na kolonu činil 10 µl, rychlost průtoku mobilní fáze byla 0,7 ml/min. Teplota kolony byla 37°C. Metabolity byly detekovány v UV oblasti při vlnové délce 296 nm. Detekováno bylo až 5 metabolitů eluovaných v retenčních časech 5,8 , 6,0 , 6,8 , 7,0 , 9,9 minuty, které odpovídají 9-hydroxy-, 12-hydroxy-, 13-hydroxy-, 7-hydroxyellipticinu a N²-oxidu ellipticinu.

3.3.2. Stanovení aktivity CYP2C9 sledováním 4'-hydroxylace diklofenaku

Aktivitu CYP2C9 je možné stanovit díky jeho schopnosti specificky oxidovat diklofenak na 4'-hydroxydiklofenak [Rendic & Di Carlo 1997]. Rovnice oxidace diklofenaku je uvedena na obrázku 11 na straně 31.



Obrázek 11 Oxidace diklofenaku na 4'-hydroxydiklofenak katalyzována CYP2C9.

Složení reakční směsi o celkovém objemu 500 μ l bylo následující:

- 100 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ pufr pH = 7,4
- 50 μ M diklofenak
- 50 μ M vandetanib resp. lenvatinib resp. cabozantinib
- 10 pmol rekombinantního CYP2C9 s cytochromem b_5 v Supersomech™
- 1 mM NADPH

Reakční směs byla připravena smícháním rekombinantního CYP2C9 s cytochromem b_5 v Supersomech™ s pufr a přidáním diklofenaku a testovaných inhibitorů tyrosikinas. V kontrolních inkubačních směsích byly roztoky inhibitorů tyrosikinas nahrazeny DMSO. Reakce byla startována přidáním roztoku NADPH. V kontrolních vzorcích byl vynechán diklofenak nebo inhibitory tyrosinkinas nebo NADPH nebo CYP2C9. Reakce probíhala 15 minut při teplotě 37°C a míchání při 450 RPM v Thermomixeru compact. K zastavení reakce byl do směsi pipetován 1 ml ethylacetátu a směs byla promíchána. Do směsi bylo přidáno 5 μ l 1 mM roztoku fenacetinu v methanolu, který byl použit jako interní standard. Směs byla třepána 2 minuty při 1400 RPM v Thermomixeru Compact a centrifugována 5 minut při 15000 \times g v centrifuze Centrifuge 5418. Horní, organická fáze byla odebrána a extrakce byla provedena ještě jedenkrát podle výše uvedeného postupu. Spojené organické fáze byly odpařeny za sníženého tlaku v evaporační centrifuze Centri Vap Concentrator. Odparky byly až do analýzy uskladněny ve tmě při teplotě -20°C.

3.3.2.1. Separace metabolitů diklofenaku

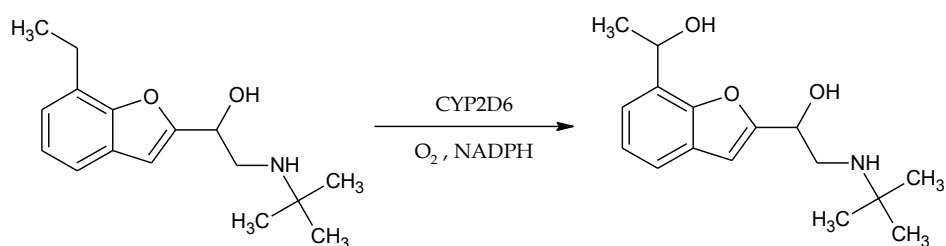
Oxidační produkty diklofenaku byly separovány pomocí vysoko účinné kapalinové chromatografie. Separace byla prováděna podle práce [Kaphalia a kol. 2006].

Separace probíhala za použití kolony NUCLEOSIL 100-5, C18 Macherey Nagel, o rozměrech 250 × 4 mm, naplněné oktadecylovaným oxidem křemičitým o velikosti zrn 5 μm. Eluce probíhala isokraticky. Mobilní fází byla směs acetonitrilu s pufrům v poměru 2:1,5. Použitý pufr byl 75 mM octan sodný pH 5,0.

Vzorky byly rozmrazeny těsně před analýzou. Odparky získané podle kapitoly 3.3.2. byly rozpuštěny v methanolu pro HPLC. „Nástřik“ na kolonu činil 10 μl, rychlost průtoku mobilní fáze byla 0,5 ml/min. Metabolit byl detekován v UV oblasti při vlnové délce 272 nm. 4'-hydroxydiklofenak byl eluován v čase 5,1 minuty.

3.3.3. Stanovení aktivity CYP2D6, 1'-hydroxylace bufuralolu

Bufuralol je cytochromem P450 2D6 oxidován na hydroxylované deriváty, hlavním metabolitem je 1'-hydroxybufuralol. Tato reakce se považuje za specifickou pro cytochrom P450 2D6 [Rendic & Di Carlo 1997]. Rovnice oxidace bufuralolu je znázorněna na obrázku 12.



Obrázek 12 Oxidace bufuralolu CYP2D6 na jeho hlavní metabolit 1'-hydroxybufuralol

Reakční směs byla připravena podle [Yamazaki a kol. 1994]. Složení reakční směsi o celkovém objemu 500 μl bylo následující:

- 100 mM KH₂PO₄/K₂HPO₄ pufr pH = 7,4
- 2 μM bufuralol
- 2 μM vandetanib resp. lenvatinib resp. cabozantinib
- 10 pmol rekombinantního CYP2D6 v Supersomech™
- 1 mM NADPH

Reakční směs byla připravena smícháním CYP2D6 v Supersomech™ s pufrem a přidáním bufuralolu a testovaných inhibitorů tyrosinkinas, v kontrolních inkubačních směsích byly roztoky inhibitorů tyrosinkinas nahrazeny DMSO. Reakce byla iniciována přidáním roztoku NADPH. V kontrolních vzorcích byl vynechán bufuralol nebo inhibitory tyrosinkinas nebo NADPH nebo CYP2D6. Reakce probíhala 15 minut při teplotě 37°C a míchání při 450 RPM v Thermomixeru compact. K zastavení reakce bylo do směsi pipetováno 50 µl 60 % kyseliny chloristé a směs byla promíchána. Sraženina proteinů a chloristanu draselného byla oddělena centrifugací Centrifuge 5418 při 15000 × g po dobu 5 minut. Supernatant byl oddělen a zmražen v tekutém dusíku. Vzorky byly až do analýzy uchovávány při -20°C.

3.3.3.1. Separace metabolitů bufuralolu

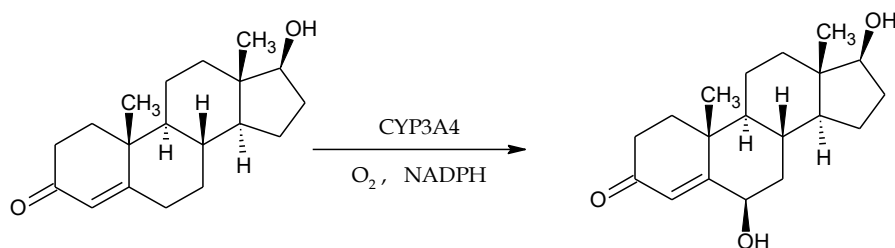
Oxidační produkty bufuralolu byly separovány pomocí vysoko účinné kapalinové chromatografie. Použitá metoda je analogická postupu popsánému dříve [Yamazaki a kol. 1994], s modifikací uvedenou v práci [Bořek-Dohalská 2002].

Separace probíhala za použití kolony NUCLEOSIL 100-5, C18 Macherey Nagel, o rozměrech 250 × 4 mm, naplněné oktadecylovaným oxidem křemičitým o velikosti zrn 5 µm. Eluce probíhala isokraticky. Mobilní fáze sestávala ze 45 % acetonitrilu v 20 mM roztoku chloristanu sodného. Eluce trvala 14 minut, u vzorků s obsahem vandetanibu 23 minut.

Vzorky byly rozmrazeny těsně před analýzou. „Nástřik“ na kolonu činil 5 µl, rychlost průtoku mobilní fáze byla 0,8 ml/min. Teplota kolony byla 25°C. Metabolity byly detekovány fluorescenční detekcí. Excitace probíhala zářením o vlnové délce 252 nm, emise při 302 nm. Eluční čas 1'-hydroxybufuralolu činí 4,2 minuty.

3.3.4. Stanovení aktivity CYP3A4 sledováním 6β-hydroxylace testosteronu

Specifickou reakcí CYP3A4 je 6β-hydroxylace testosteronu [Rendic & Di Carlo 1997]. Proto byla zvolena i pro stanovení aktivity CYP3A4 v předkládané bakalářské práci. Schéma reakce je uvedeno na obrázku 13 na straně 34



Obrázek 13 Oxidace testosteronu na 6β-hydroxytestosteron

Reakce byla prováděna podle práce [Brian a kol. 1990] s úpravami. Složení reakční směsi o celkovém objemu 500 μ l bylo následující:

- 100 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ pufr pH = 7,4
- 50 μ M testosteron
- 50 μ M vandetanib resp. lenvatinib resp. cabozantinib
- 10 pmol rekombinantního CYP2D6 v Supersomech™
- 1 mM NADPH

Reakční směs byla připravena smícháním CYP3A4 v Supersomech™ s pufrům a přidáním testosteronu a testovaných inhibitorů tyrosinkinas, v kontrolních inkubačních směsích byly roztoky inhibitorů tyrosinkinas nahrazeny DMSO. Reakce byla startována přidáním roztoku NADPH. V kontrolních vzorcích byl buď vynechán testosteron nebo inhibitory tyrosinkinas nebo NADPH, nebo CYP3A4. Reakce probíhala 15 minut při teplotě 37°C a míchání při 450 RPM v Thermomixeru compact. K ukončení reakce byla použita extrakce pomocí 1 ml ethylacetátu. Do vzorků bylo pipetováno 5 μ l 1 mM roztoku fenacetinu v methanolu, který byl použit jako interní standard. Směs byla třepána 2 minuty při 1400 RPM v Thermomixeru Compact a centrifugována 5 minut při $15000 \times g$ v centrifuze Centrifuge 5418. Horní, organická fáze byla odebrána a extrakce byla provedena ještě jedenkrát podle výše uvedeného postupu. Spojené organické fáze byly odpařeny za sníženého tlaku v evaporační centrifuze Centri Vap Concentrator. Odparky byly až do analýzy uskladněny ve tmě při teplotě -20°C.

3.3.4.1. Separace metabolitů testosteronu

Separace produktů oxidace testosteronu byla prováděna pomocí vysoko účinné kapalinové chromatografie, vychází z práce [Brian a kol. 1990].

Separace probíhala za použití kolony NUCLEOSIL 100-5, C18 Macherey Nagel, o rozměrech 250×4 mm, naplněné oktadecylovaným oxidem křemičitým o velikosti zrn $5 \mu\text{m}$. Eluce probíhala isokraticky. Mobilní fáze sestávala ze 70 % methanolu v ultračisté vodě.

Odparky získané v experimentech popsaných v kapitole 3.3.4. byly rozpuštěny v $50 \mu\text{l}$ methanolu těsně před analýzou. „Nástřik“ na kolonu činil $10 \mu\text{l}$, rychlost průtoku mobilní fáze byla $0,6 \text{ ml/min}$. Teplota kolony byla 37°C . Metabolity testosteronu byly detekovány v UV oblasti při vlnové délce 254 nm . 6β -hydroxytestosteron byl eluován v retenčním čase $6,4$ minuty.

3.3.5. Oxidace ellipticinu peroxidasami

Reakční směsi byly připraveny a zpracovány podle práce [Stiborová a kol. 2007]. Složení reakční směsi o celkovém objemu $500 \mu\text{l}$ bylo následující:

- 100 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ pufr $\text{pH} = 7,4$
- $10 \mu\text{M}$ ellipticin
- $10 \mu\text{M}$ vandetanib resp. lenvatinib resp. cabozantinib
- $1 \mu\text{g}$ křenová peroxidasa nebo $2 \mu\text{g}$ laktoperoxidasa resp. myeloperoxidasa
- $50 \mu\text{M}$ peroxid vodíku

Reakční směsi byly připraveny smícháním pufru s ellipticinem a jedním z testovaných inhibitorů tyrosinkinas. Do roztoku byla přidána jedna z peroxidas a reakci startoval roztok peroxidu vodíku. Kontrolní reakční směsi byly připraveny bez ellipticinu nebo inhibitorů tyrosinkinas s nebo peroxidu vodíku nebo enzymu. Reakce probíhala při 37°C po dobu 15 minut za míchání při 450 RPM v Thermomixeru Compact. Reakce byla ukončena přidáním 1 ml ethylacetátu a promícháním. Do směsi bylo pipetováno $5 \mu\text{l}$ 1 mM fenacetinu v methanolu, který byl použit jako interní standard. Vzorky byly protřepávány 2 minuty při laboratorní teplotě rychlosti 1400 RPM v Thermomixeru Compact. Fáze byly separovány na centrifuze Centrifuge 5418 po dobu 5 minut při $15000 \times g$. Horní, organická, fáze byla odebrána a extrakce byla provedena ještě jednou stejným způsobem. Spojené organické fáze

byly odpařeny za sníženého tlaku v evaporační centrifuze Centri Vap Concentrator. Vzorky byly až do analýzy uskladněny ve tmě při teplotě -20°C.

3.3.5.1. Oxidace ellipticinu ovčí cyklooxygenasou 1

Složení reakční směsi o celkovém objemu 500 µl bylo následující:

- 100 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ pufr pH = 7,4
- 10 µM ellipticin
- 10 µM vandetanib resp. lenvatinib resp. cabozantinib
- 1 µM hematin
- 7,5 µg cyklooxygenasy 1
- 25 µM peroxid vodíku

Reakční směsi byly připraveny analogickým způsobem popsaným v kapitole 3.3.5., s následujícími odchylkami, např. kontrolní vzorky byly připraveny buď bez ellipticinu nebo bez TKIs nebo bez hematinu nebo bez peroxidu vodíku nebo bez enzymu.

3.3.5.2. Oxidace ellipticinu lidskou thyreoperoxidasou

Složení reakční směsi o celkovém objemu 500 µl bylo následující:

- 100 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ pufr pH = 7,4
- 10 µM ellipticin
- 10 µM vandetanib resp. lenvatinib resp. cabozantinib
- 2 µg thyreoperoxidasy
- 25 µM peroxid vodíku

Reakční směsi byly připraveny analogickým postupem popsaným v kapitole 3.3.5..

3.3.5.3. Separace produktů oxidace ellipticinu peroxidasami

Oxidační produkty ellipticinu byly separovány pomocí vysoko účinné kapalinové chromatografie. Separace byla provedena podle [Poljaková a kol. 2005] s modifikacemi.

Separace probíhala za použití kolony ULTRASPHERE ODS Beckman, rozměrů $250 \times 4,6$ mm, naplněné oktadecylovaným oxidem křemičitým o velikosti zrn $5 \mu\text{m}$. Eluce probíhala gradientem methanolu od 45 do 90 % v 10 mM roztoku octanu amonného pH 2,8 od 9 do 12 minuty: celková doba eluce byla 30 minut.

Odparky získané v experimentech popsaných v kapitolách 3.3.5., 3.3.5.1. a 3.3.5.2. byly rozpuštěny v $50 \mu\text{l}$ methanolu. „Nástřik“ na kolonu činil $5 \mu\text{l}$, rychlost průtoku mobilní fáze byla $0,8 \text{ ml/min}$. Teplota kolony byla 37°C . Metabolit, dimer ellipticinu, byl detekován v UV oblasti při vlnové délce 296 nm . Dimer ellipticinu byl eluován v retenčním čase 16,0 až 16,2 minut.

3.3.6. Analýza dat

Chromatogramy zaznamenaný HPLC systémem byly vyhodnoceny za pomoci programu Chromeleon 7™.

Získaná data byla dále zpracována v programu MS Excel 2016. Data z kapitol 3.3.1. a 3.3.5. byly kvantifikovány vztažením ploch produktů oxidace ellipticinu na plochu píku interního standardu.

Data z kapitol 3.3.2., 3.3.3. a 3.3.4. byla analyzována pomocí kalibračních křivek, získaných měřením ploch píků metabolitů o známé koncentraci. Relativní aktivita byla vyjádřena vztažením aktivita vzorku s inhibitory tyrosinkinas k aktivitě kontrolního vzorku.

Statistická analýza dat byla provedena pomocí *f*-testu a Studentova *t*-testu v programu MS Excel 2016 .

4. Výsledky

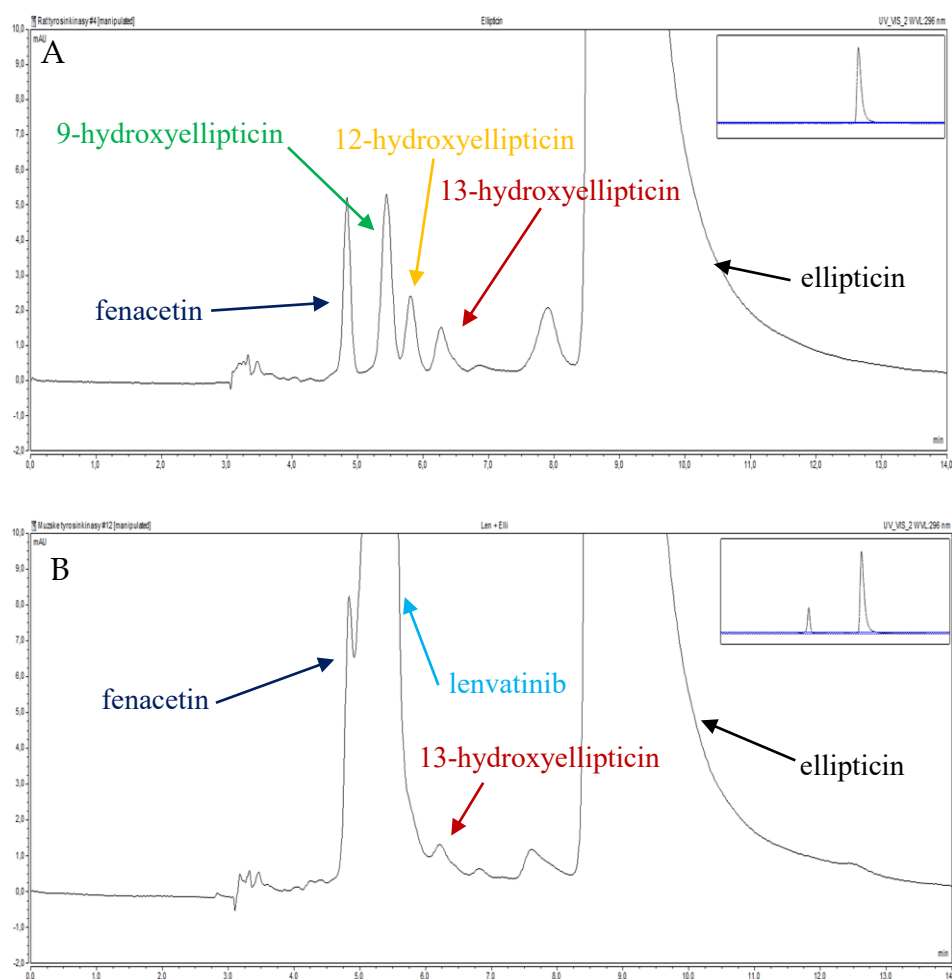
4.1. Vliv vandetanibu, lenvatinibu a cabozantinibu na oxidaci ellipticinu jaterními mikrosomy člověka a potkana

Enzymy lidských a potkaních jaterních mikrosomů oxidují ellipticin na tři majoritní metabolity: 9-hydroxy-, 12-hydroxy-, 13-hydroxyellipticin. Další metabolity: 7-hydroxyellipticin a ellipticin-*N*²-oxid, byly tvořeny na hranici detekovatelnosti a nebyly proto kvantifikovány. Lidské jaterní mikrosomy (mužů) oxidují ellipticin za přítomnosti NADPH na uvedené metabolity analogicky jako mikrosomy jater žen. Rozdíly mezi mikrosomy byly minimální, a proto výsledky těchto experimentů s mikrosomy jater žen nejsou v práci uvedeny.

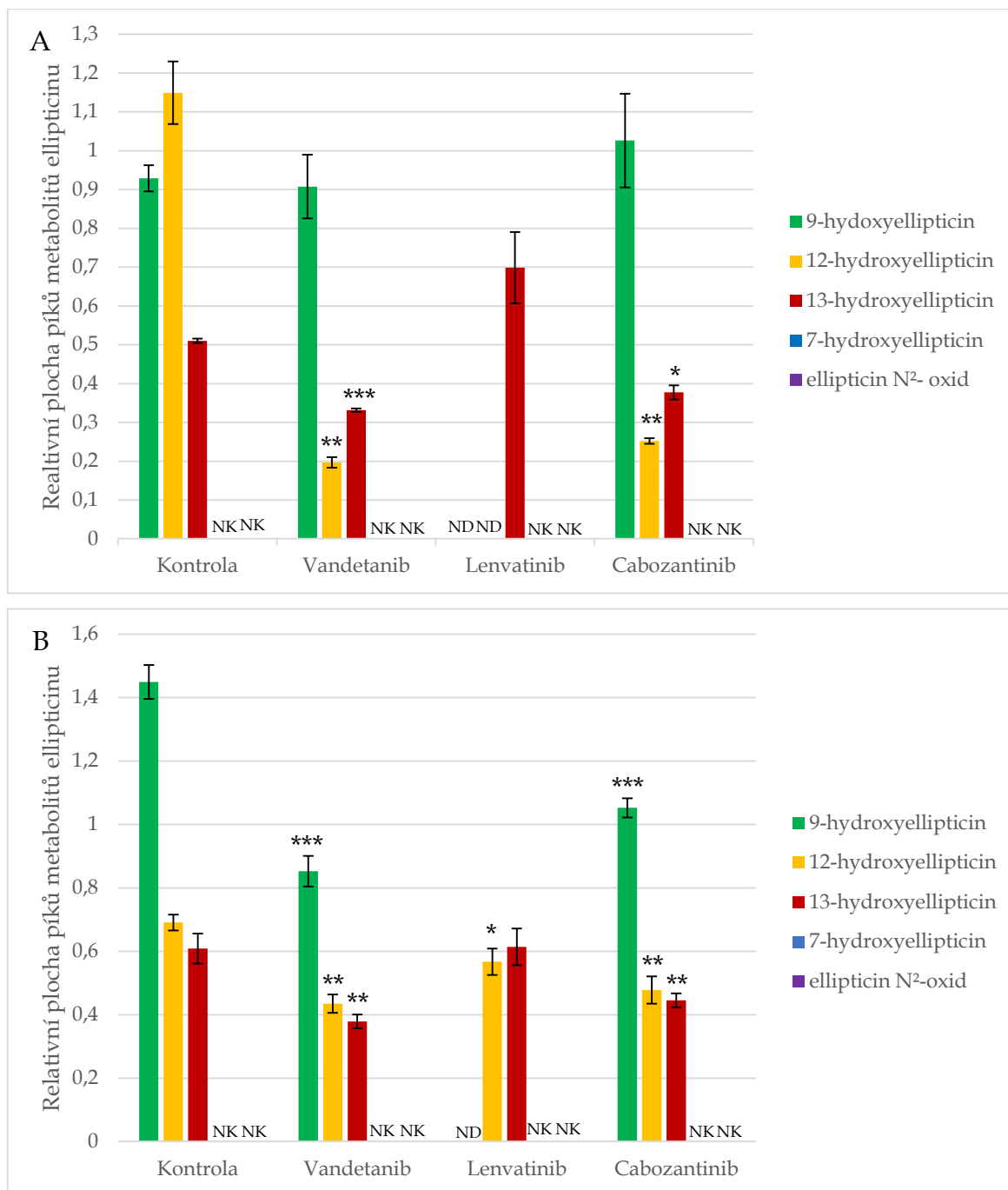
Metabolity ellipticinu byly separovány ve všech případech, kontrolních vzorcích, ale i těch, kde se zkoumal vliv testovaných TKIs, stejnou metodou HPLC. Vandetanib a cabozantinib jsou eluovány v retenčních časech, které jsou rozdílné od elučních časů metabolitů ellipticinu. Lenvatinib je eluován v retenčním čase 5,8 minuty a jeho eluční pík překrývá pík 9-hydroxyellipticinu nebo 9-hydroxy- a 12-hydroxyellipticinu (Obr. 14 na straně 39).

Oxidace ellipticinu na 12-hydroxy- a 13-hydroxyellipticin mikrosomy je inhibována vandetanibem a cabozantinibem. Lenvatinib sice vyvolal mírné zvýšení množství tvořeného 13-hydroxyellipticinu, zvýšení však nebylo statisticky významné. V kontrastu k tomu, vandetanib a cabozantinib nemají na 9-hydroxylaci ellipticinu vliv (Obr. 15 A na straně 40).

Oxidace ellipticinu jaterními mikrosomy potkana je inhibována všemi třemi testovanými inhibitory tyrosinkinás. Vandetanib a cabozantinib snižují tvorbu 9-hydroxy-, 12-hydroxy- a 13-hydroxyellipticinu. Lenvatinib snižuje pouze tvorbu 13-hydroxyellipticinu (Obr. 15 B na straně 40).



Obrázek 14 HPLC produktů oxidace ellipticinu lidskými jaterními mikrosomy za nepřítomnosti lenvatinibu (A) a za přítomnosti lenvatinibu (B). Reakční směs obsahovala 50 μ M ellipticin, 0,25 mg mikrosomálního proteinu a 1 mM NADPH. Kolona C18, 5 μ m, 250 \times 4,6 mm ULTRASHPHERE, detekce 296 nm, 37°C, průtok mobilní fáze 0,7 ml/min. Mobilní fázi byl 64 % methanol ve vodě obsahující 32 mM kyselinu octovou a 5 mM heptansulfonát sodný.



Obrázek 15 Vliv vandetanibu, lenvatinibu a cabozantinibu na oxidaci ellipticinu lidskými (A) a potkaními (B), jaterními mikrosomy. Uvedená data jsou průměry a standardní odchylky ze tří experimentů. Data byla analyzována pomocí Studentova *t*-testu, *** $P < 0,001$; ** $P < 0,01$; * $P < 0,05$, ND – nebyl detekován, NK – nebyl kvantifikován

4.2. Vlivu vandetanibu, lenvatinibu a cabozantinibu na oxidaci ellipticinu rekombinantními cytochromy P450 člověka a potkana

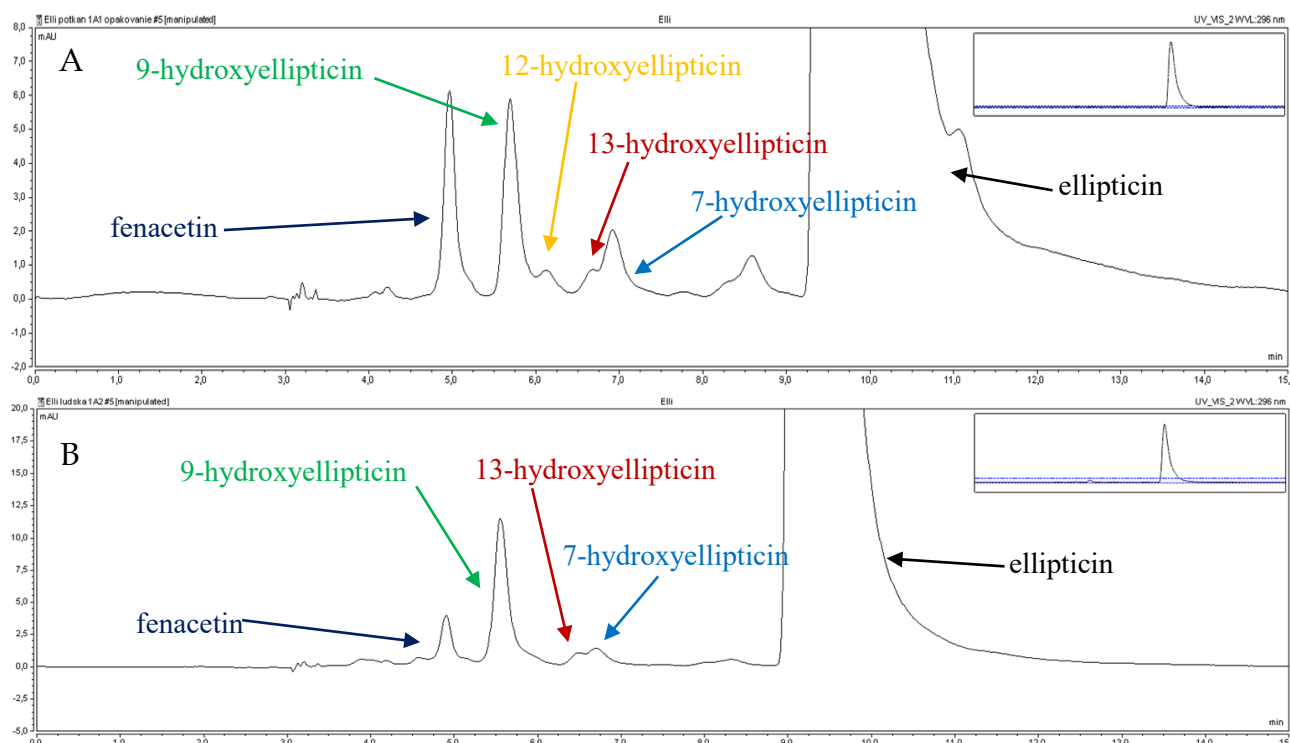
Cytochromy P450 (CYP) oxidují ellipticin za přítomnosti NADPH až na pět metabolitů, a to 9-hydroxy-, 12-hydroxy-, 13-hydroxy-, 7-hydroxyellipticin a *N*²-oxid ellipticinu, přičemž různé CYP oxidují ellipticin na jeho jednotlivé metabolity v různém poměru [Stiborová & Frei 2014]. Provedené experimenty si kladly za cíl zjistit vliv vandetanibu, lenvatinibu a cabozantinibu na metabolismus ellipticinu rekombinantními cytochromy P450 1A1 a 1A2 člověka a potkana, lidským 2C9 s cytochromem *b*₅, lidskými 2D6 a 3A4 s nebo bez cytochromu *b*₅ a potkaní 2D1 a 3A1 za přítomnosti cytochromu *b*₅.

Analogicky jako v případě jaterních mikrosomů lenvatinib interferoval na chromatogramech s 9-hydroxy- a 12-hydroxyellipticinem a jeho pík s elučným časem 5,8 minuty znemožňoval detekci uvedených metabolitů (Obr. 14 na straně 39).

Cytochromy P450 1A1 a 1A2 člověka a potkana oxidovaly ellipticin až na čtyři metabolity: 9-hydroxy-, 12-hydroxy-, 13-hydroxy- a 7-hydroxyellipticin. Retenční časy zachycuje obrázek 16 A na straně 42. Majoritním metabolitem ellipticinu je 9-hydroxyellipticin, ostatní metabolity jsou tvořeny v daleko menší míře. V případě oxidace ellipticinu CYP1A2 člověka bylo pozorováno, že malý pík 12-hydroxyellipticinu téměř splýval s píkem 9-hydroxyellipticinu přítomného ve vysokém množství, (Obr. 16 B na straně 42).

V případě katalýzy lidským CYP1A1 došlo k mírnému snížení tvorby 12-hydroxyellipticinu působením vandetanibu, na druhé straně však cabozantinib mírně zvyšoval tvorbu tohoto metabolitu. Lenvatinib mírně zvyšoval množství tvořeného 13-hydroxyellipticinu (Obr. 17 A na straně 43).

Lenvatinib vyvolal inhibici 13-hydroxylace ellipticinu katalyzovanou potkaním CYP1A1. Cabozantinib mírně zvyšoval množství 9-hydroxy- a 7-hydroxyellipticinu (Obr. 17 B na straně 43).



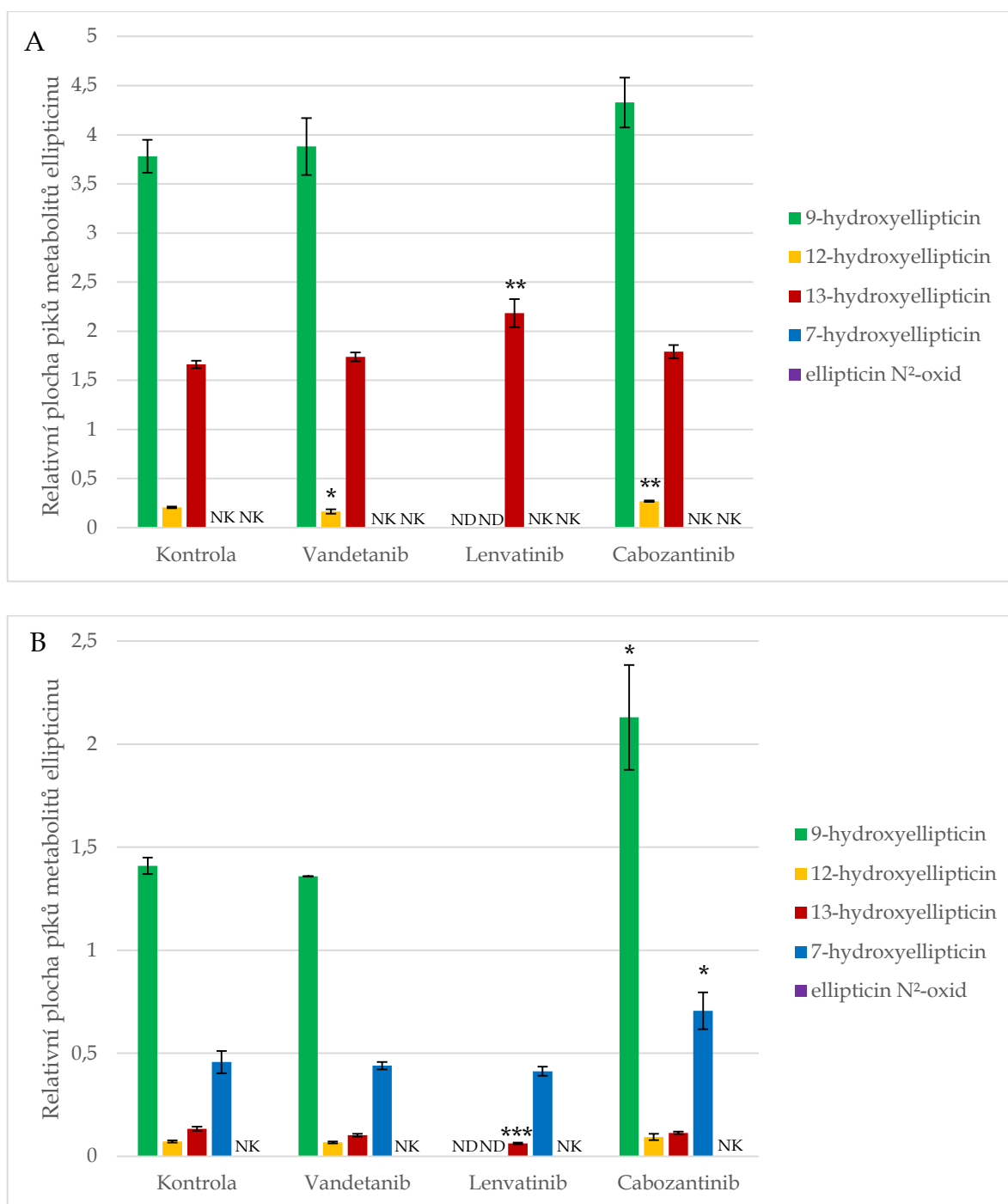
Obrázek 16 HPLC produktů oxidace ellipticinu potkaním CYP1A1 (A) a lidským CYP1A2 (B). Reakční směs obsahovala 50 μ M ellipticin, 50 pmol CYP a 1 mM NADPH. Kolona C18, 5 μ m, 250 \times 4,6 mm ULTRASHPHERE, detekce 296 nm, 37°C, průtok mobilní fáze 0,7 ml/min. Mobilní fází byl 64 % methanol ve vodě obsahující 32 mM kyselinu octovou a 5 mM heptansulfonát sodný.

Žádná z testovaných látek neměla vliv na oxidaci ellipticinu lidským CYP1A2 (Obr. 18 A na straně 44).

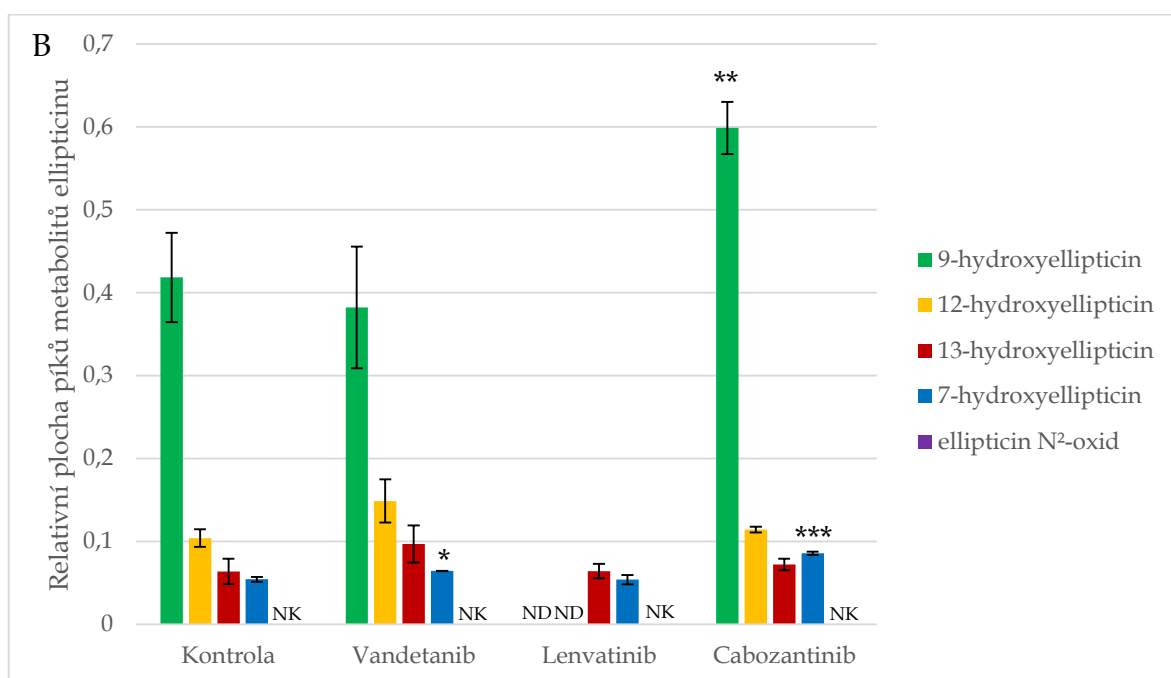
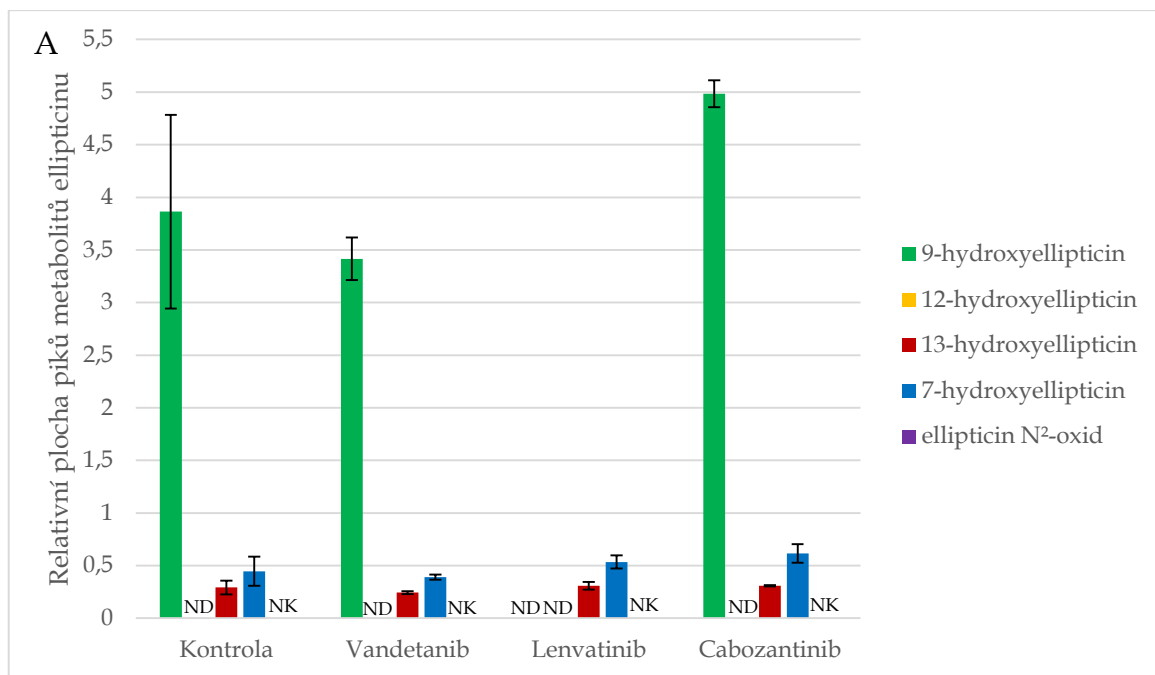
Oxidace ellipticinu potkaním CYP1A2 na 9-hydroxy- a 7-hydroxyellipticin byla stimulována cabozantinibem. Mírný stimulační účinek byl také pozorován na tvorbu 7-hydroxyellipticinu, a to působením vandetanibu (Obr. 18 B na straně 44)

V případě lidských a potkaních CYP1A1 a CYP1A2 je možné konstatovat, že zkoumané inhibitory tyrosinkinasy nemají prakticky žádný inhibiční účinek na oxidaci ellipticinu těmito enzymy.

Při porovnání lidských CYP1A1 a CYP1A2 s jejich potkaními orthology je patrné, že potkaní enzymy v porovnání s lidskými, oxidují ellipticin méně efektivně, nicméně při porovnání poměru tvořených metabolitů mezi sebou se dá konstatovat, že jsou si podobné.



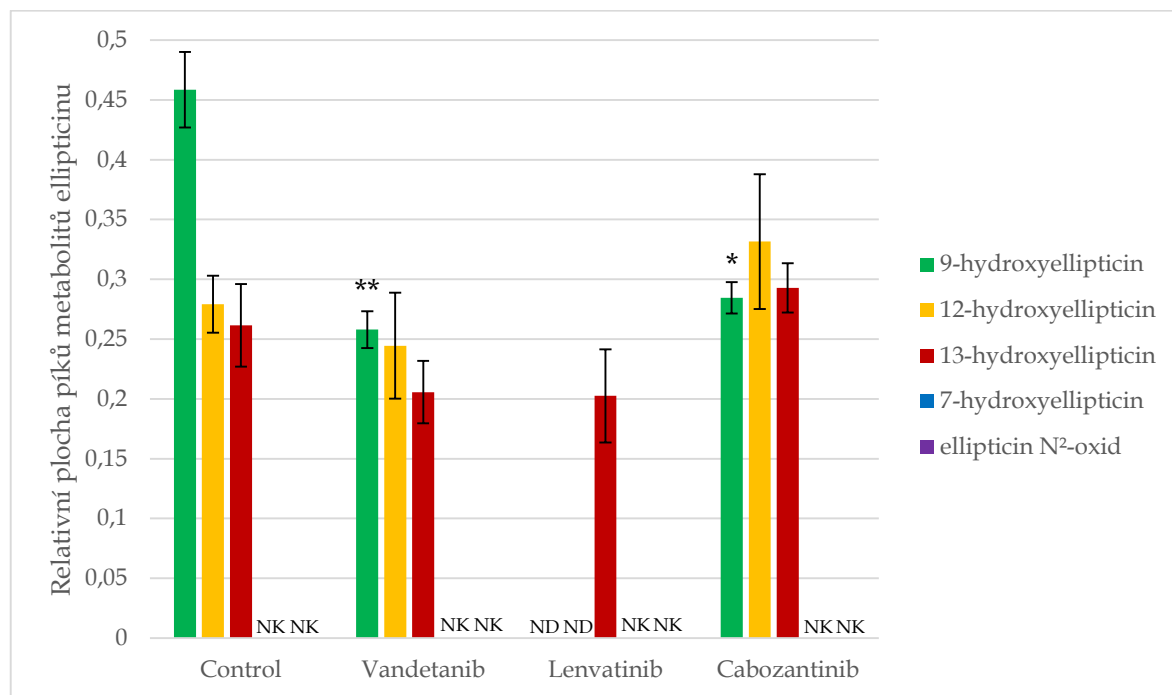
Obrázek 17 Vliv vandetanibu, lenvatinibu a cabozantinibu na oxidaci ellipticinu lidským (A) a potkaním (B) CYP1A1. Uvedená data jsou průměry a standardní odchylky ze tří experimentů. Data byla analyzována pomocí Studentova *t*-testu, *** $P < 0,001$; ** $P < 0,01$; * $P < 0,05$, ND – nebyl detekován, NK – nebyl kvantifikován



Obrázek 18 Vliv vandetanibu, lenvatinibu a cabozantinibu na oxidaci ellipticinu lidským (A) a potkaním (B) CYP1A2. Uvedená data jsou průměry a standardní odchylky ze tří experimentů. Data byla analyzována pomocí Studentova *t*-testu, *** $P < 0,001$; ** $P < 0,01$; * $P < 0,05$, ND – nebyl detekován, NK – nebyl kvantifikován

Produkty oxidace ellipticinu CYP2C9 za přítomnosti NADPH jsou 9-hydroxy-, 12-hydroxy- a 13-hydroxyellipticin. Grafické znázornění relativních ploch tvořených metabolitů je uvedeno na obrázku 19.

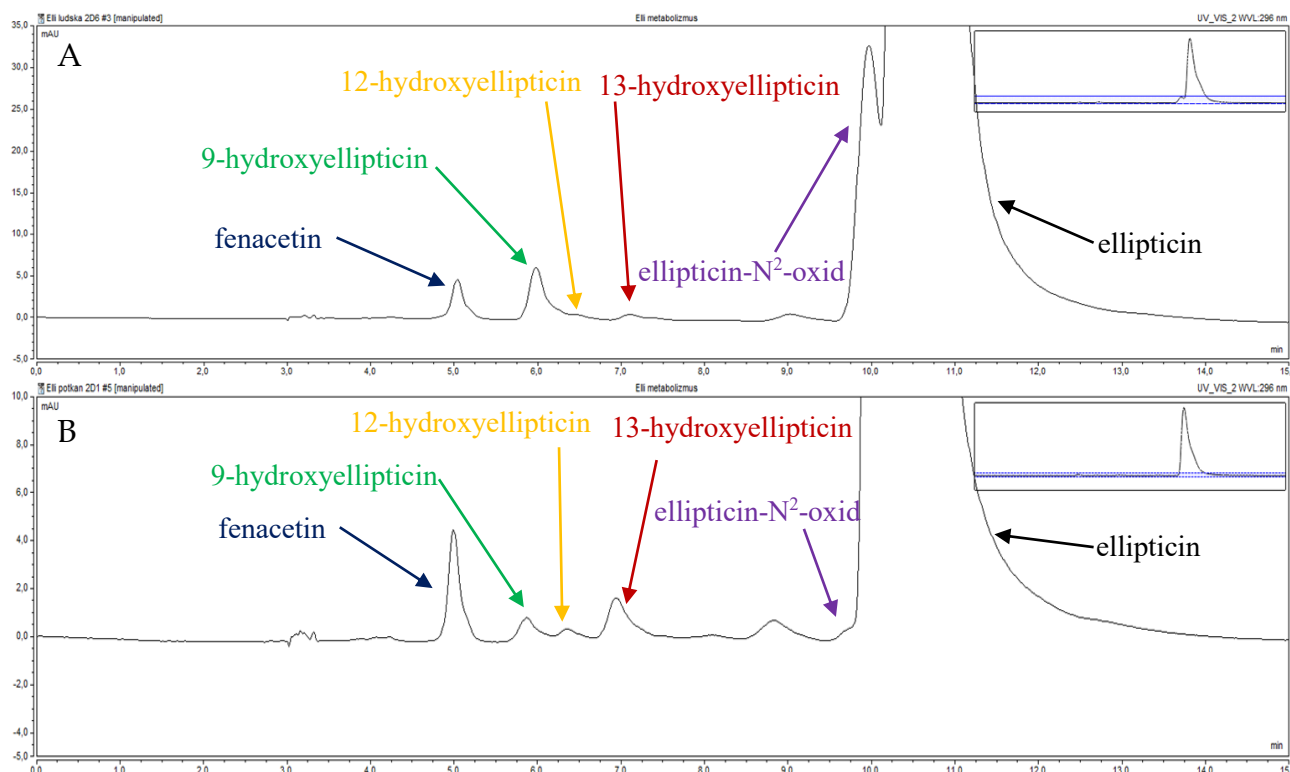
Vandetanib a cabozantinib snižují oxidaci ellipticinu na 9-hydroxyellipticin, tvorba ostatních hydroxylovaných metabolitů nebyla pozměněná přítomností zkoumaných inhibitorů tyrosinkinasy (Obr. 19).



Obrázek 19 Vliv vandetanibu, lenvatinibu a cabozantinibu na oxidaci ellipticinu lidským CYP2C9. Uvedená data jsou průměry a standardní odchylky ze tří experimentů. Data byla analyzována pomocí Studentova *t*-testu, ****P*<0,001; ***P*<0,01; **P*<0,05, ND – nebyl detekován, NK – nebyl kvantifikován

Lidský cytochrom P450 2D6 a CYP2D1 potkana oxidují ellipticin na čtyři metabolity: 9-hydroxy-, 12-hydroxy-, 13-hydroxyellipticin a *N*²-oxid ellipticinu. Při porovnání množství a poměru metabolitů vznikajících oxidací ellipticinu lidským CYP2D6 a jeho potkaním orthologem CYP2D1 je možné pozorovat, že rozdíly jejich efektivity jsou značné. Porovnání profilů HPLC užitých pro separaci produktů metabolismu ellipticinu oběma cytochromy P450 je uvedeno na obrázku 20 na straně 46. Na obrázku 21 na straně 47 je uvedeno grafické vyhodnocení dat. Hlavním rozdílem je skutečnost, že majoritním metabolitem ellipticinu, který je efektivně tvořen CYP2D6, je *N*²-oxid ellipticinu, za ním následuje 9-hydroxy-, 13-

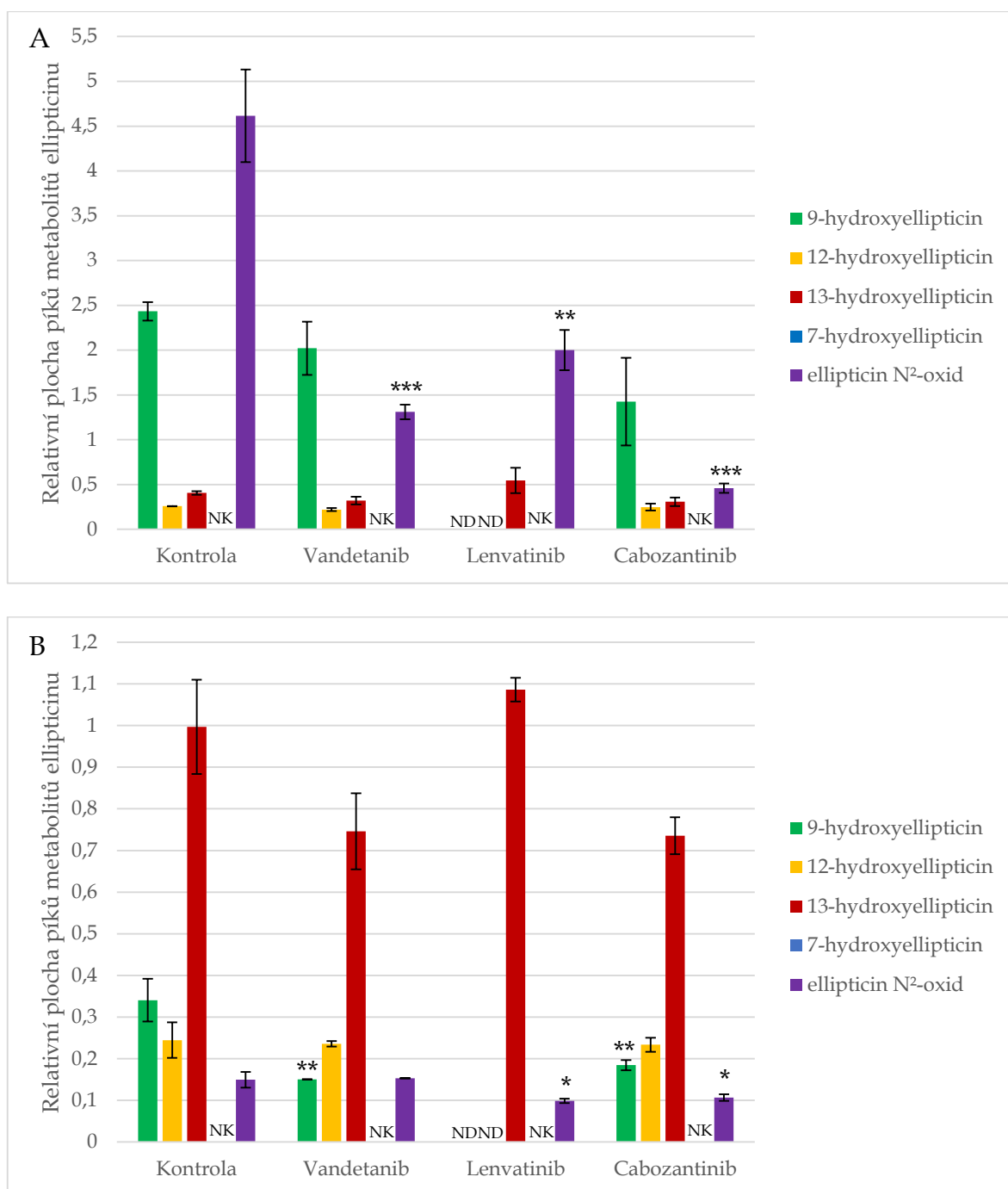
hydroxy- a nejméně byl tvořen 12-hydroxyellipticin. CYP2D1 rovněž oxiduje ellipticin, a to za tvorby 13-hydroxyellipticinu. V menším množství vzniká 9-hydroxy-, 12-hydroxyellipticin. Nejméně je ellipticin oxidován CYP2D1 na N^2 -oxid ellipticinu (Obr. 21 na straně 47).



Obrázek 20 HPLC produktů oxidace ellipticinu lidským CYP2D6 (A) a potkaním CYP2D1 (B). Reakční směs obsahovala 50 μ M ellipticin, 50 pmol CYP a 1 mM NADPH. Kolona C18, 5 μ m, 250 \times 4,6 mm ULTRASHPHERE, detekce 296 nm, 37°C, průtok mobilní fáze 0,7 ml/min. Mobilní fází byl 64 % methanol ve vodě obsahující 32 mM kyseliny octové a 5 mM heptansulfonátu sodného.

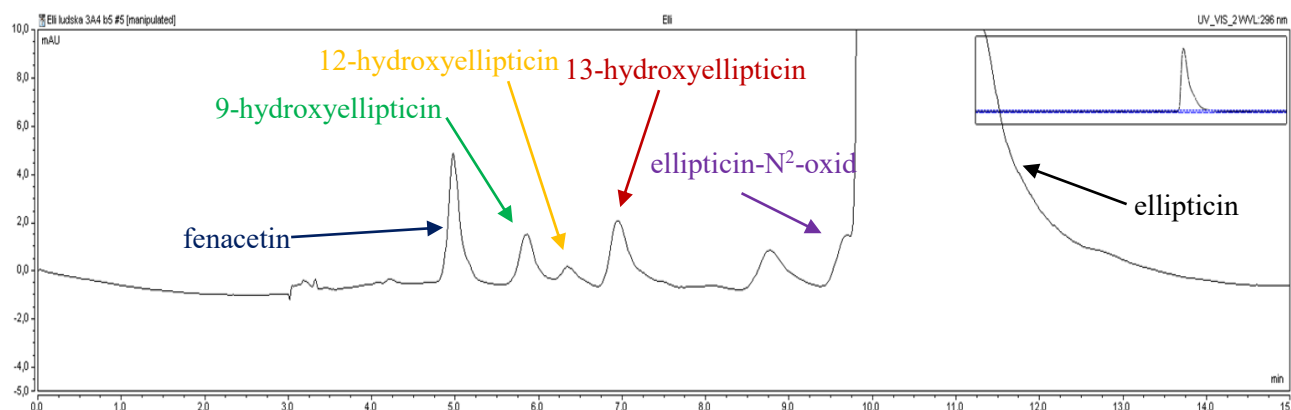
Vandetanib, lenvatinib i cabozantinib vykazují inhibiční účinek na N^2 -oxidaci ellipticinu cytochromem P450 2D6. Míra inhibice roste od lenvatinibu ke cabozantinibu. Naopak testované látky prakticky nevyvolaly změny tvorby ostatních oxidačních metabolitů ellipticinu, což ukazují výsledky uvedené na obrázku 21 A na straně 47.

V případě potkaního CYP2D1 nejsou inhibiční vlivy testovaných látek tak výrazné jako v případě jeho lidského orthologu. Lenvatinib, společně s cabozantinibem mírně, ale statisticky signifikantně, snižují koncentraci N^2 -oxidu ellipticinu. Zároveň cabozantinib a vandetanib mírně inhibují vliv na 9-hydroxylaci ellipticinu (Obr. 21 B na straně 47).



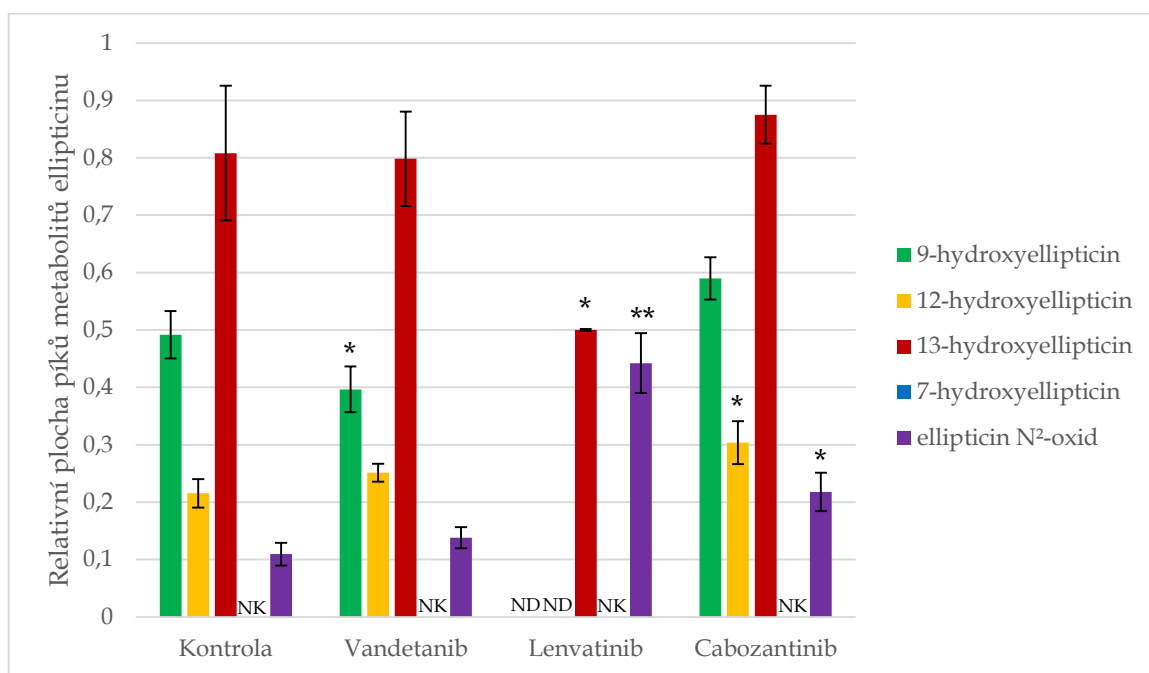
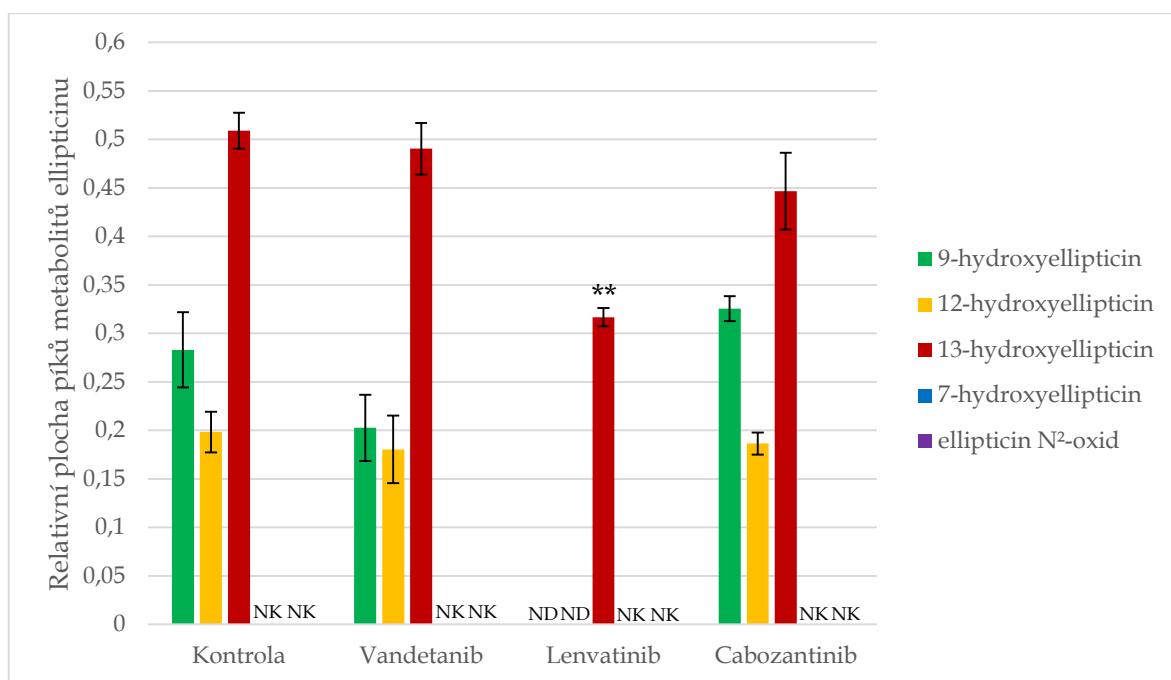
Obrázek 21 Vliv vandetanibu, lenvatinibu a cabozantinibu na oxidaci ellipticinu lidským CYP2D6 (A) a potkaním CYP2D1 (B). Uvedená data jsou průměry a standardní odchylky ze tří experimentů. Data byla analyzována pomocí Studentova *t*-testu, *** $P < 0,001$; ** $P < 0,01$; * $P < 0,05$, ND – nebyl detekován, NK – nebyl kvantifikován

Cytochromy P450 3A oxidují ellipticin až na čtyři metabolické produkty, a to 9-hydroxy-, 12-hydroxy-, 13-hydroxyellipticin a N^2 -oxid ellipticinu. Hlavním produktem je ve všech třech případech 13-hydroxyellipticin (Obr. 23 A a B na straně 49) a (Obr. 24 na straně 50). N^2 -oxid ellipticinu byl prokazatelně detekován pouze v reakčních směsích obsahujících CYP3A4 s cytochromem b_5 (Obr. č. 23 B na straně 49). Chromatogram separace produktů oxidace ellipticinu CYP3A4 za přítomnosti cytochromu b_5 pomocí HPLC je uvedený na obrázku 22.



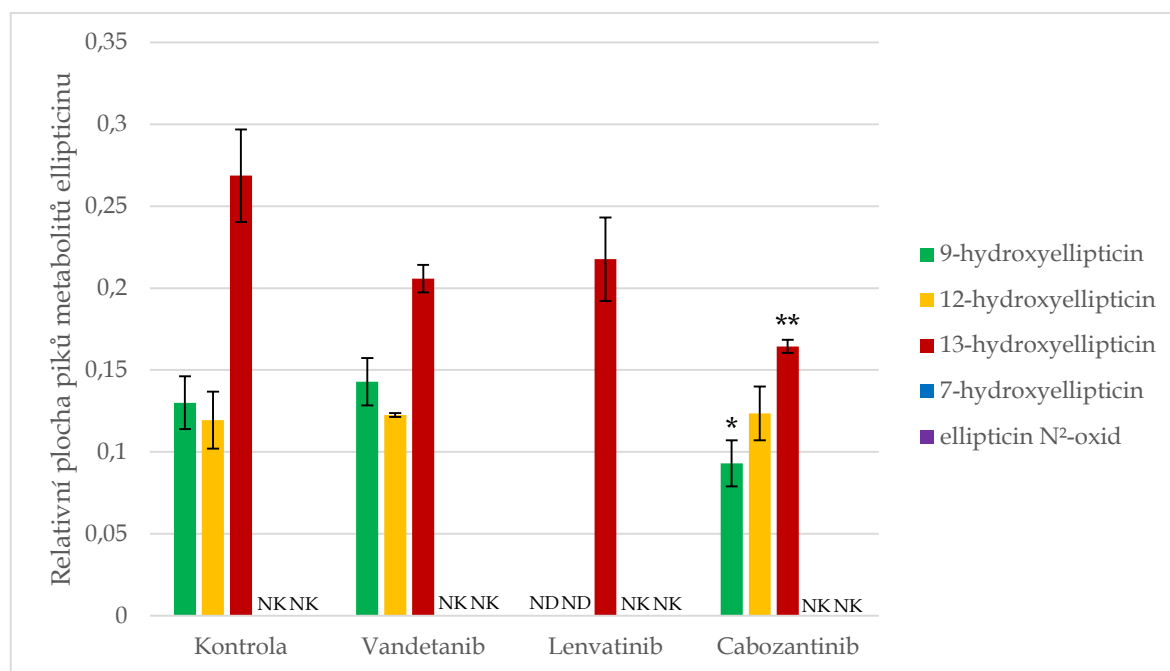
Obrázek 22 HPLC produktů oxidace ellipticinu lidským CYP3A4 za přítomnosti cytochromu b_5 . Reakční směs obsahovala 50 μ M ellipticin, 50 pmol CYP a 1 mM NADPH. Kolona C18, 5 μ m, 250 \times 4,6 mm ULTRASHPHERE, detekce 296 nm, 37°C, průtok mobilní fáze 0,7 ml/min. Mobilní fází byl 64 % methanol ve vodě obsahující 32 mM kyseliny octové a 5 mM heptansulfonátu sodného.

Lenvatinib slabě inhibuje 13-hydroxylaci ellipticinu katalyzovanou CYP3A4 člověka jak v přítomnosti, tak i v nepřítomnosti cytochromu b_5 (Obr. 23 A a B na straně 49). Tvorba N^2 -oxidu ellipticinu působením CYP3A4 s cytochromem b_5 byla stimulována lenvatinibem (Obr. 23 B na straně 49). Mírná, ale signifikantní, stimulace tvorby 12-hydroxyellipticinu a N^2 -oxidu ellipticinu se projevila v reakční směsi obsahující cabozantinib. Vandetanib v malém rozsahu snižuje tvorbu 9-hydroxyellipticinu katalyzovanou CYP3A4 za přítomnosti cytochromu b_5 (Obr. 23 B na straně 49).



Obrázek 23 Vliv vandetanibu, lenvatinibu a cabozantinibu na oxidaci elliptycinu lidským CYP3A4 bez přítomnosti cytochromu *b*₅ (A) a za přítomnosti cytochromu *b*₅ (B). Uvedená data jsou průměry a standardní odchylky ze tří experimentů. Data byla analyzována pomocí Studentova *t*-testu, ****P*<0,001; ***P*<0,01; **P*<0,05, ND – nebyl detekován, NK – nebyl kvantifikován

Potkaní CYP3A1 oxidoval ellipticin prakticky analogicky v přítomnosti vandetanibu a lenvatinibu, tak při absenci těchto inhibitorů tyrosinkinasy. Cabozantinib signifikantně snižuje množství tvořeného 9-hydroxy- a 13-hydroxyellipticinu, neovlivňuje ale tvorbu 12-hydroxyellipticinu, (Obr. 24).



Obrázek č. 24 Vliv vandetanibu, lenvatinibu a cabozantinibu na oxidaci ellipticinu potkaním CYP3A1 za přítomnosti cytochromu *b*₅. Uvedená data jsou průměry a standardní odchylky ze tří experimentů. Data byla analyzována pomocí Studentova *t*-testu, ****P*<0,001; ***P*<0,01; **P*<0,05, ND – nebyl detekován, NK – nebyl kvantifikován

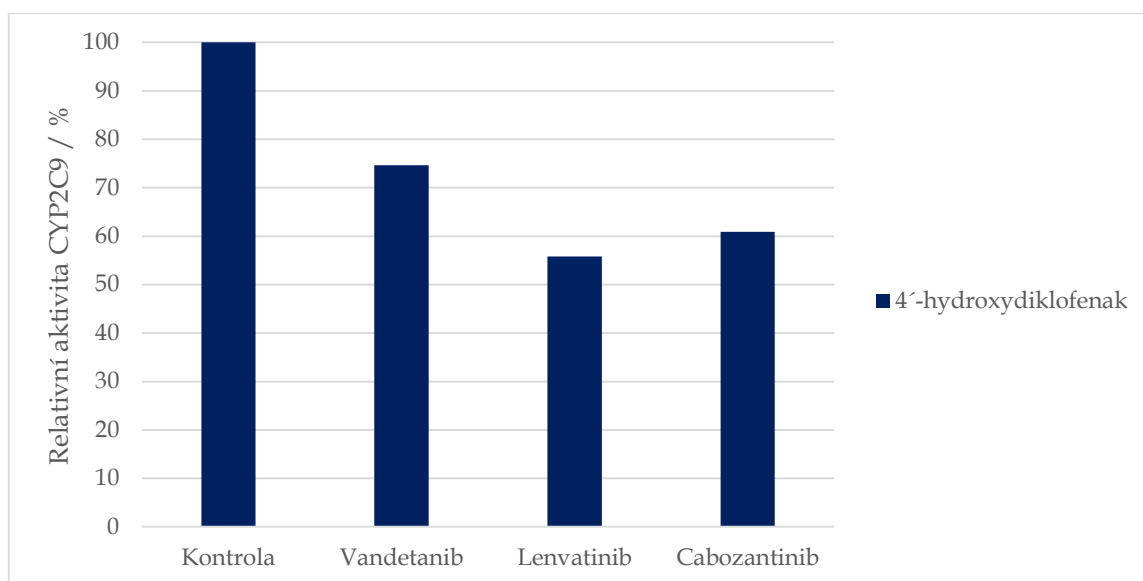
4.3. Vliv vandetanibu, lenvatinibu a cabozantinibu na aktivitu cytochromů P450 2C9, 2D6 a 3A4

Výsledky popsané v kapitole 4.2. poukazují na skutečnost, že testované inhibitory tyrosinkinas mají inhibiční účinky na metabolismus ellipticinu katalyzovaný CYP2C9, 2D6 a 3A4. Tyto cytochromy P450 zároveň hrají roli v metabolismu nejen ellipticinu, ale i jiných farmak [Stiborová & Frei 2014], [Skálová a kol. 2011]. Otázkou tedy je, zda-li inhibice oxidace ellipticinu testovanými inhibitory tyrosinkinas je unikátní pro tento substrát nebo, zda-li tyto inhibitory tyrosinkinas působí rovněž i na oxidaci jiných substrátů těchto enzymů. V následující části práce jsou uvedeny výsledky studia vlivu vandetanibu, lenvatinibu a cabozantinubu na oxidaci tzv. „markerových“ substrátů těchto cytochromů P450 [Rendic & Di Carlo 1997].

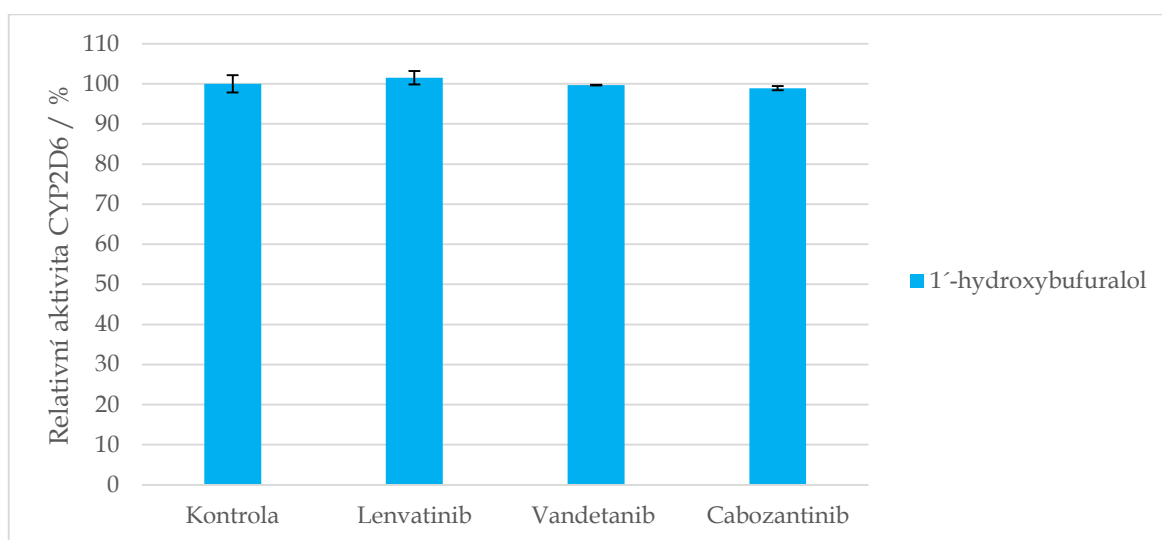
Specifickou reakcí katalyzovanou CYP2C9 je oxidace diklofenaku na 4'-hydroxydiklofenak [Transon C a kol. 1996]. Aktivita enzymu za přítomnosti testovaných inhibitorů tyrosinkinas je uvedena na obrázku 25. Výsledky oxidace diklofenaku nebylo možné statisticky analyzovat, protože ze tří hodnot získaných měřeními, byla vždy jedna výrazně odlehlá a byla proto z kvantifikace aktivity enzymu vyloučena. V obrázku je uveden pouze průměr dvou hodnot získaných měřeními.

Z obrázku 25 na straně 52, je patrné, že všechny testované látky vykazují inhibiční efekt na aktivitu CYP2C9, měřenou 4'-hydroxylací diklofenaku. Aktivita CYP2C9 byla snížena na 75 až na 55 %.

Aktivita CYP2D6 byla zjišťována stanovením koncentrace 1'-hydroxybufuralolu, který je produktem oxidace bufuralolu v prostředí NADPH. Na obrázku 26 na straně 52 jsou uvedeny výsledky experimentů sledujících vliv inhibitorů tyrosinkinas na oxidaci bufuralolu. Jak je z obrázku patrné, vandetanib, lenvatinib, a ani cabozantinib oxidaci bufuralolu CYP2D6 neovlivňují.

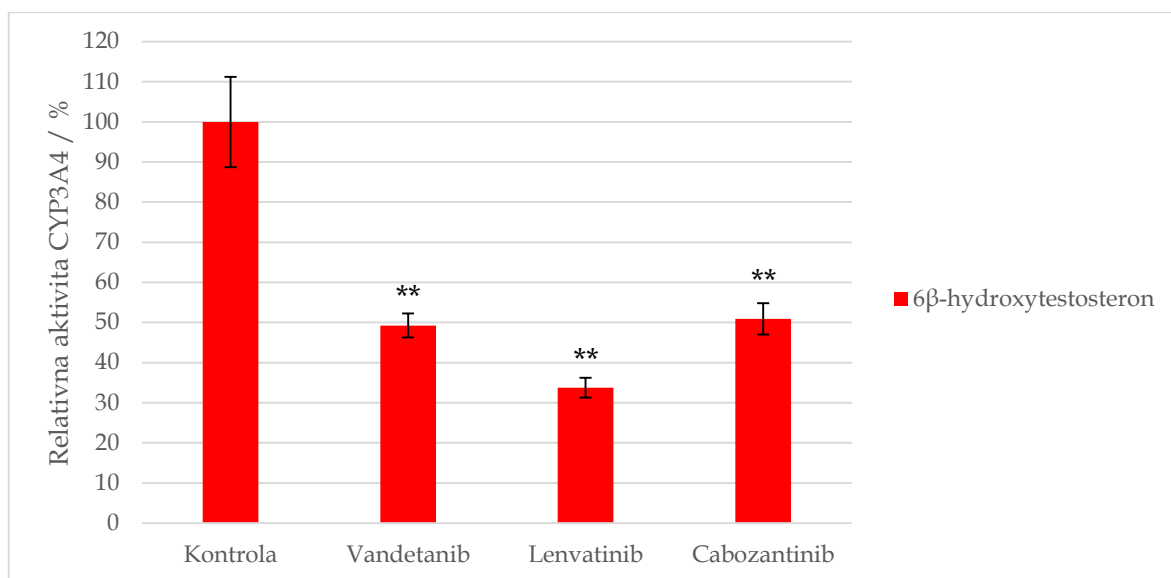


Obrázek 25 Vliv vandetanibu, lenvatinibu a cabozantinibu na oxidaci diklofenaku lidským CYP2C9 s cytochromem b₅. Aktivita vzorku s inhibitory tyrosinkinas je vztažena k aktivitě kontrolního vzorku. Data v obrázku jsou průměry ze dvou experimentů.



Obrázek 26 Vliv vandetanibu, lenvatinibu a cabozantinibu na oxidaci bufuralolu lidským CYP2D6. Uvedená data jsou průměry a standardní odchylky ze tří experimentů. Data byla analyzována pomocí Studentova *t*-testu, *** $P < 0,001$; ** $P < 0,01$; * $P < 0,05$, Aktivita vzorku s inhibitory tyrosinkinas je vztažena k aktivitě kontrolního vzorku.

Stanovení 6 β -hydroxylace testosteronu bylo využito ke stanovení aktivity CYP3A4. Výsledky poukazují, že testované inhibitory tyrosinkinas mají na 6 β -hydroxylaci testosteronu inhibiční účinek. Vandetanib a cabozantinib vyvolávaly prakticky stejný inhibiční efekt, účinek lenvatinibu na oxidaci testosteronu byl ještě výraznější (Obr. 27).



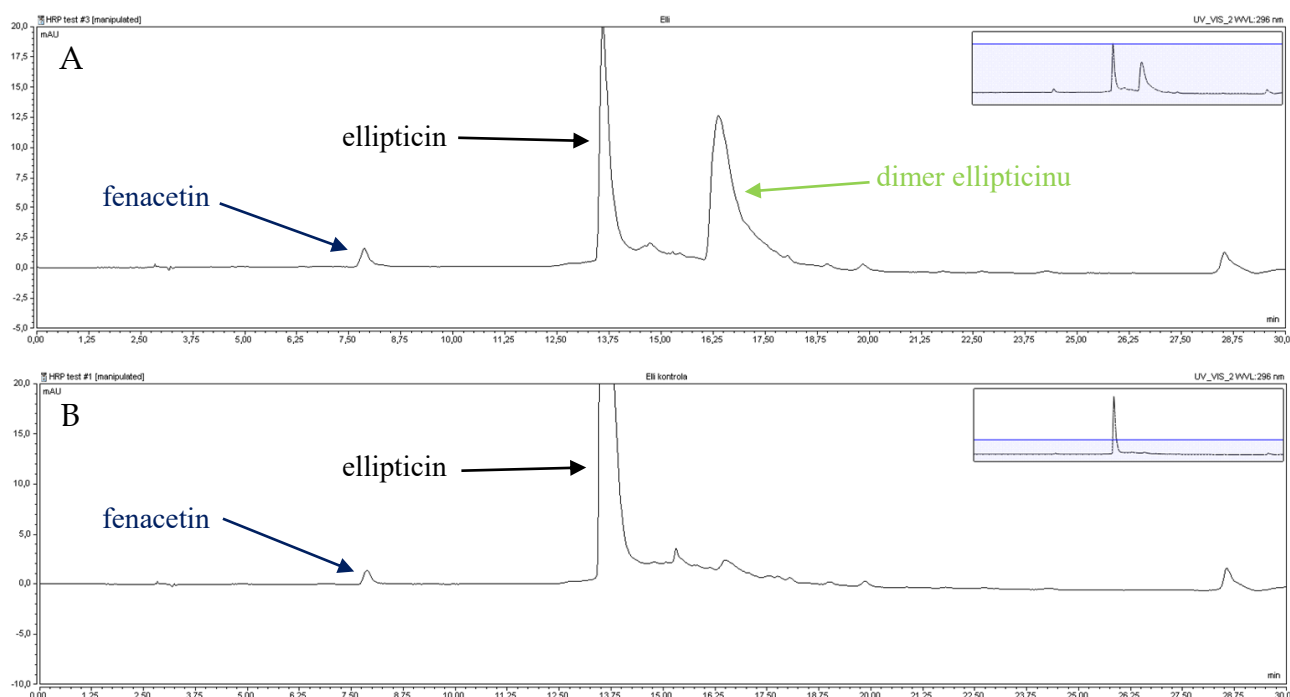
Obrázek 27 Vliv vandetanibu, lenvatinibu a cabozantinibu na oxidaci testosteronu lidským CYP3A4 s cytochromem b₅. Uvedená data jsou průměry a standardní odchylky ze tří experimentů. Data byla analyzována pomocí Studentova *t*-testu, ****P*<0,001; ***P*<0,01; **P*<0,05, Aktivita vzorku s inhibitory tyrosinkinas je vztažena k aktivitě kontrolního vzorku.

Výše uvedené výsledky ukazují, že testované inhibitory tyrosinkinas inhibují oxidaci diklofenaku katalyzovanou CYP2C9 a taktéž 6 β -hydroxylaci testosteronu pomocí CYP3A4 (Obr. 25 na straně 52) a (Obr. 27).

Na druhé straně při zkoumání vlivu inhibitorů tyrosinkinas na tvorbu 1'-hydroxybufuralolu katalyzovanou CYP2D6 nebyl pozorován žádný efekt na tuto reakci (Obr. 26 na straně 52).

4.4. Vliv vandetanibu, lenvavtinibu a cabozantinibu na oxidaci ellipticinu křenovou peroxidasou, laktoperoxidasou, myeloperoxidasou a cyklooxygenasou-1

Peroxidasy za přítomnosti peroxidu vodíku oxidují ellipticin na majoritní metabolický produkt, dimer ellipticinu. Chromatogram zobrazující separaci ellipticinu a produktů jeho oxidace v reakční směsi pomocí HPLC, která sestávala z ellipticinu, peroxidu vodíku a peroxidasy v pufru, je uvedena na obrázku 28 A. Za nepřítomnosti peroxidu vodíku nebo peroxidasy dimer ellipticinu nevzniká (Obr. 28 B).



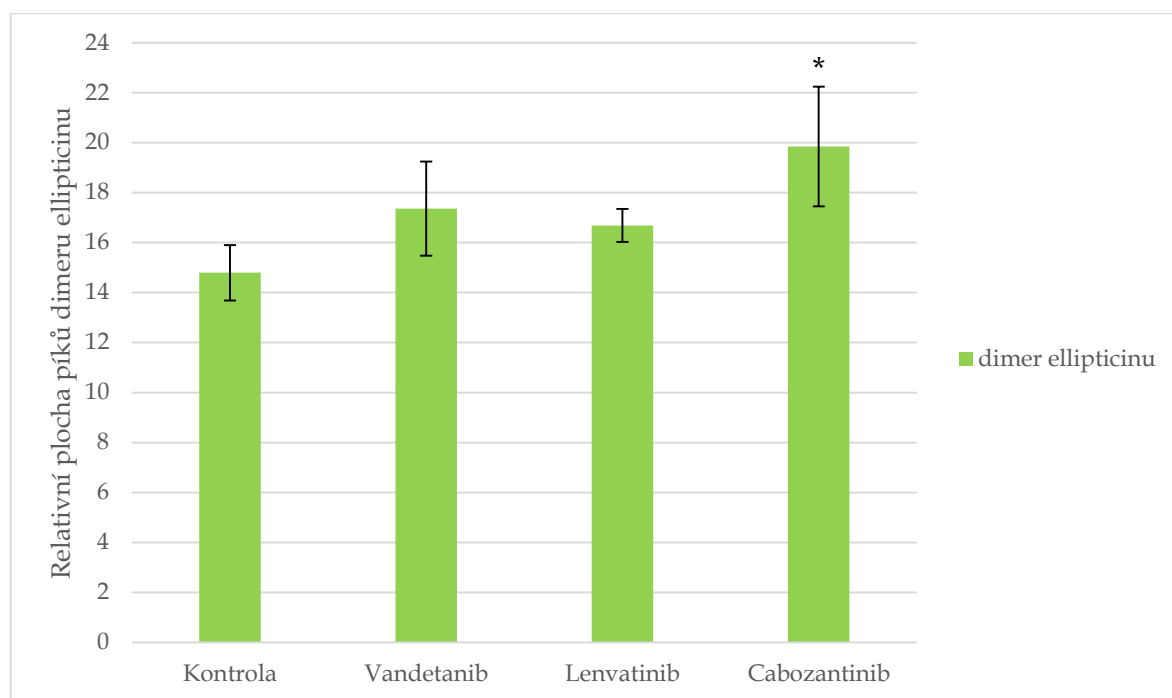
Obrázek 28 HPLC produktů oxidace ellipticinu křenovou peroxidasou za přítomnosti peroxidu vodíku (A), (B) kontrolní inkubační směs, ve které nebyl přítomen peroxid vodíku nebo křenová peroxidasa. Reakční směs obsahovala 10 μM ellipticin, 50 μM peroxid vodíku a 1 μg křenové peroxidasy (typ VI). Kolona C18, 5 μm , 250 \times 4,6 mm ULTRASHPHERE, detekce 296 nm, 37°C, průtok mobilní fáze 0,8 ml/min, gradient methanolu od 45-90% v 10 mM octanu amonném pH = 2,8.

Křenová peroxidasa, laktoperoxidasa a myeloperoxidasa oxidují ellipticin v přítomnosti peroxidu vodíku na dimer ellipticinu. Na obrázku 29 na straně 55 a obrázcích 30 a 31 na straně 56 jsou shrnuty výsledky experimentů ovlivnění oxidace ellipticinu inhibitory tyrosinkinas vandetanibem, lenvatinibem a cabozantinibem výše uvedenými peroxidasami.

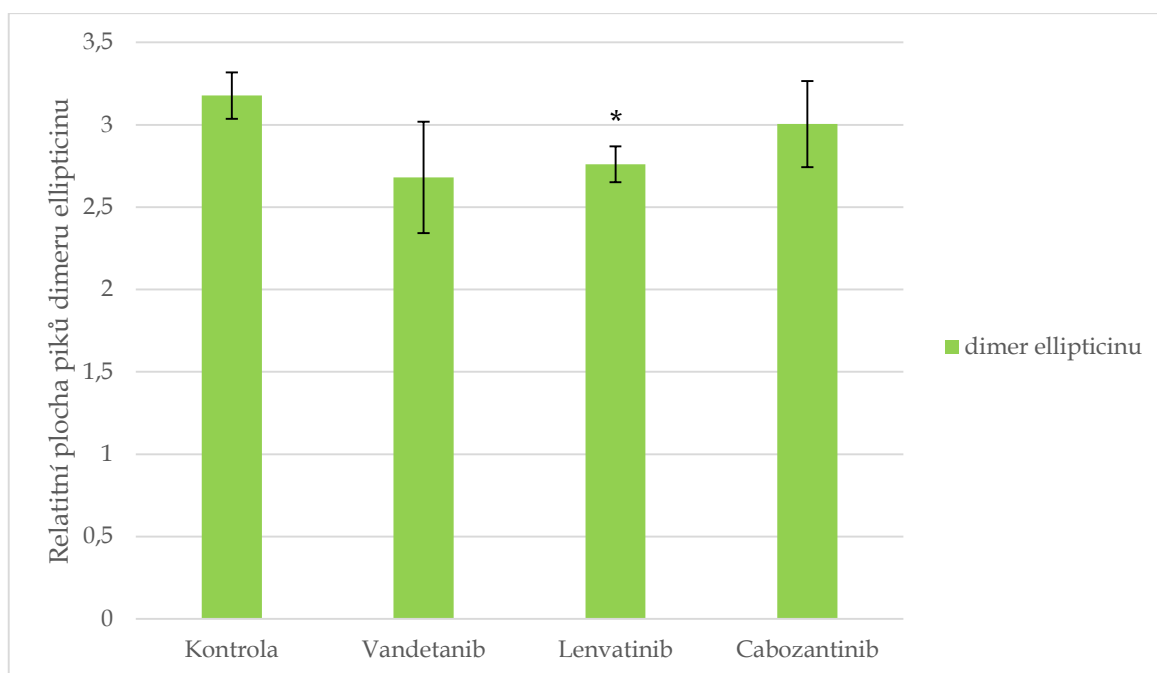
Ve všech případech oxidace ellipticinu peroxidasami prakticky nedochází k ovlivnění oxidace ellipticinu. Statistická analýza ukázala, že v případě křenové peroxidasy dochází pouze k malému, ale statisticky signifikantnímu zvýšení množství dimeru ellipticinu za přítomnosti cabozantinibu. Vandetanib a lenvatinib oxidaci ellipticinu tímto enzymem neovlivňují (Obr. 29).

Lenvatinib mírně snižuje tvorbu dimeru ellipticinu laktoperoxidasou. Vandetanib a cabozantinib tuto reakci, oxidaci ellipticinu laktoperoxidasou, neovlivily (Obr. 30 na straně 56).

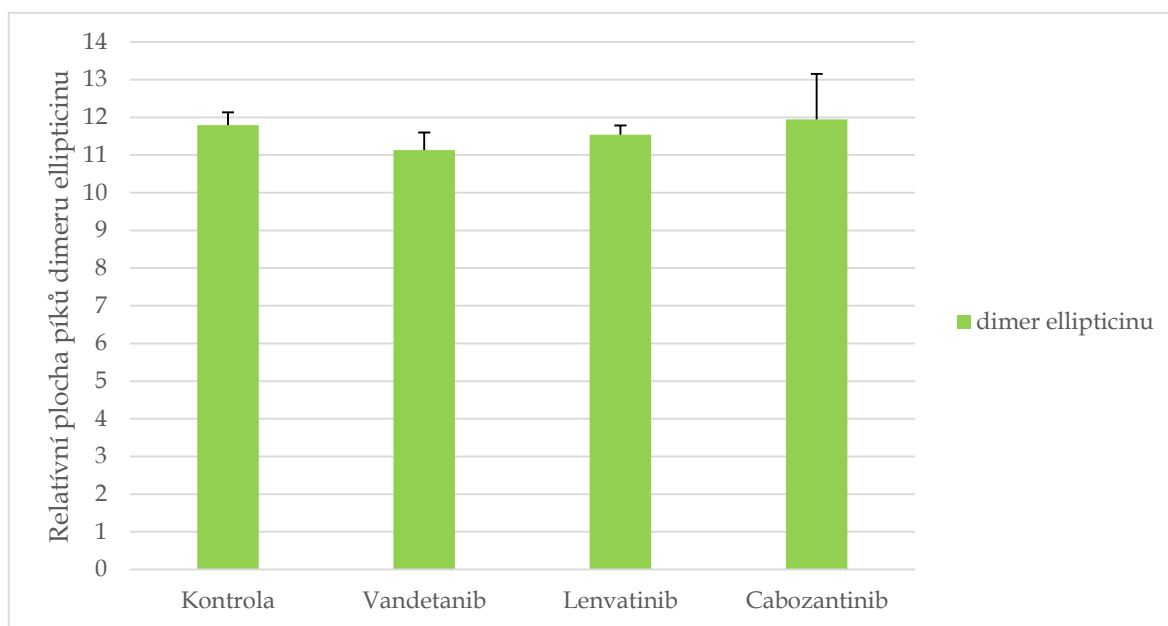
V případě myeloperoxidasy nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly mezi množství dimeru ellipticinu vzniklého v přítomnosti testovaných látek v porovnání s kontrolou (Obr. 31 na straně 56).



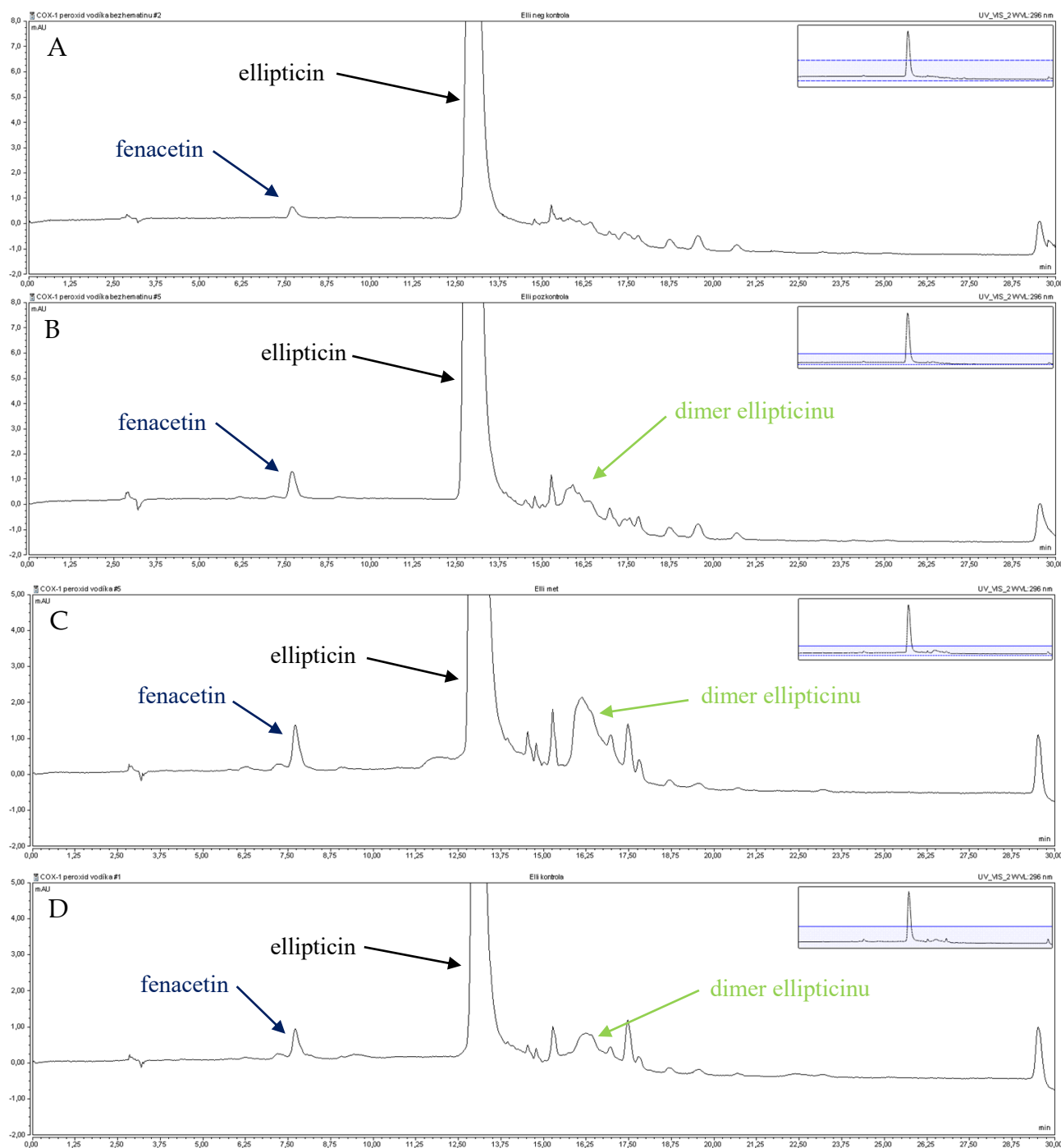
Obrázek 29 Vliv vandetanibu, lenvatinibu a cabozantinibu na oxidaci ellipticinu křenovou peroxidasou. Uvedená data jsou průměry a standardní odchylky tří experimentů. Data byla analyzována pomocí Studentova *t*-testu, *** $P < 0,001$; ** $P < 0,01$; * $P < 0,05$,



Obrázek 30 Vliv vandetanibu, lenvatinibu a cabozantinibu na oxidaci elliptycinu laktoperoxidasou. Uvedená data jsou průměry a standardní odchylky ze tří experimentů. Data byla analyzována pomocí Studentova *t*-testu, *** $P < 0,001$; ** $P < 0,01$; * $P < 0,05$,



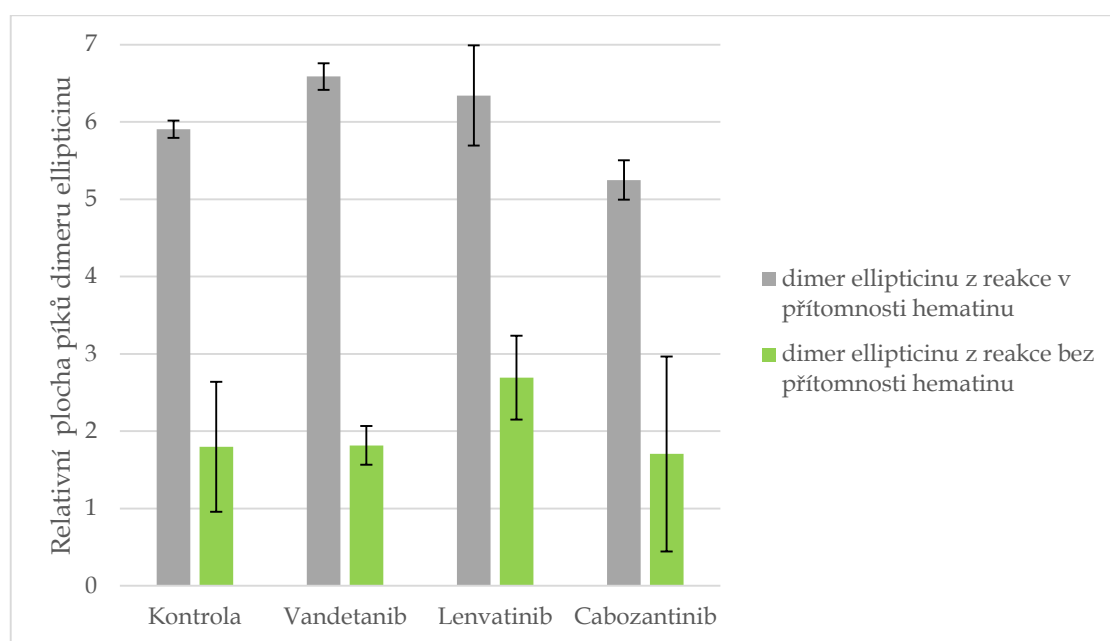
Obrázek 31 Vliv vandetanibu, lenvatinibu a cabozantinibu na oxidaci elliptycinu myeloperoxidasou. Uvedená data jsou průměry a standardní odchylky ze tří experimentů. Data byla analyzována pomocí Studentova *t*-testu, *** $P < 0,001$; ** $P < 0,01$; * $P < 0,05$,



Obrázek 32 HPLC produktů oxidace ellipticinu z reakční směsi obsahující ellipticin a peroxid vodíku (A), směsi obsahující ellipticin, COX-1 a peroxid vodíku (B), směsi obsahující ellipticin, COX-1, peroxid vodíku a hematin (C) a z reakční směsi obsahující ellipticin, peroxid vodíku a hematin (D). Reakční směs obsahovala 10 μM ellipticin, 25 μM peroxid vodíku, 7,5 μg COX-1 a 1 μM hematin. Kolona C18, 5 μm , 250 \times 4,6 mm ULTRASHPHERE, detekce 296 nm, 37°C, průtok mobilní fáze 0,8 ml/min, gradient methanolu od 45-90% v 10 mM octanu amonném pH = 2,8.

Obrázek 32 na straně 57 znázorňuje separace metabolitů ellipticinu prostaglandin H synthasou 1 (cyklooxygenasou 1) pomocí HPLC. Ze získaných výsledků vyplývá, že peroxid vodíku sám o sobě ellipticin neoxiduje (Obr. 32 A na straně 57). Za přítomnosti cyklooxygenasy je však ellipticin oxidován, ale množství tvořeného dimeru ellipticinu je výrazně nižší, než je tvorba tohoto metabolitu křenovou peroxidasou, laktoperoxidasou či myeloperoxidasou (Obr. 32 B straně 57).

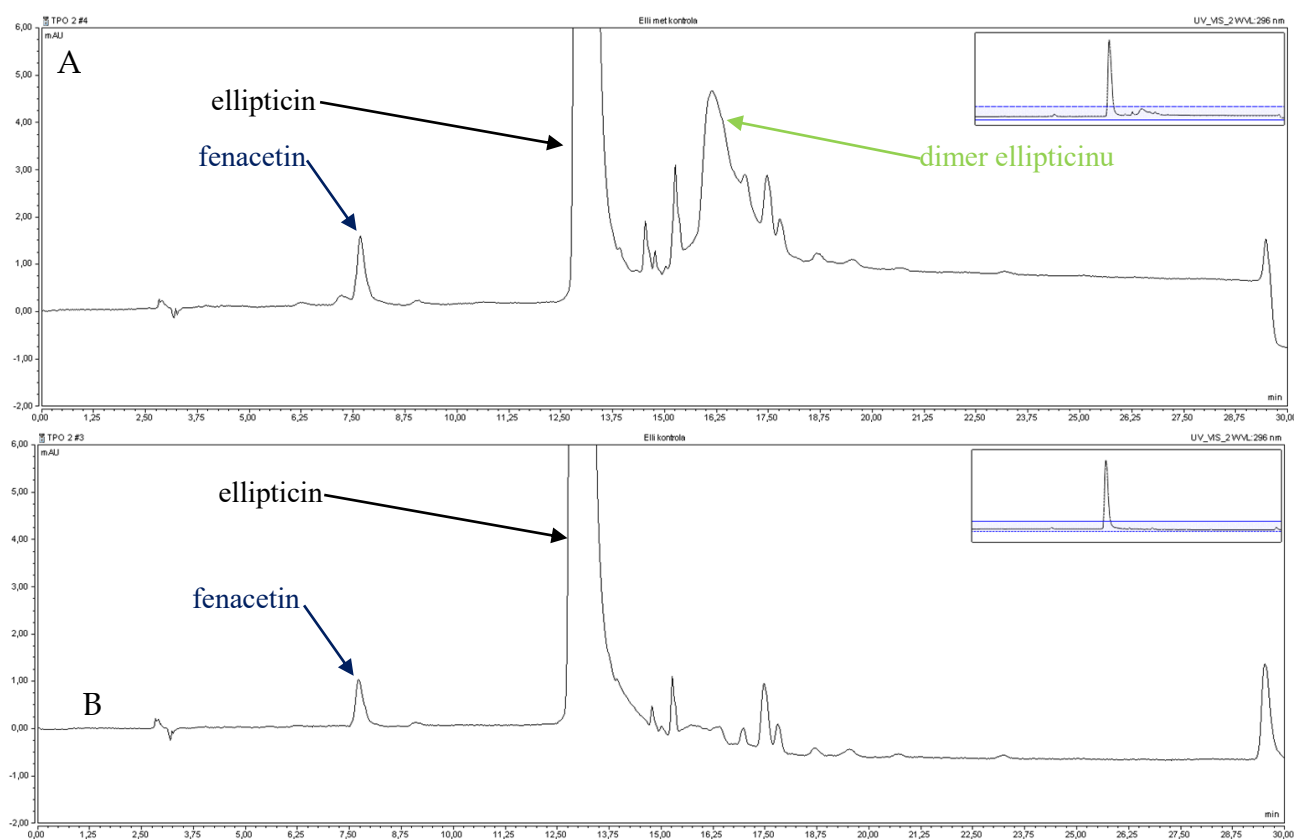
V předchozích studiích bylo uvedeno, že cyklooxygenasa vyžaduje pro svou aktivitu hematin [Stiborová a kol. 2002]. Testovali jsme proto, jak hematin ovlivňuje oxidaci ellipticinu cyklooxygenasou 1. Hematin přítomný v reakční směsi stimuloval oxidaci ellipticinu (Obr. 32 C na straně 57) a (Obr. 33 šedou barvou označená data), navíc samotný hematin i bez cyklooxygenasy částečně oxiduje ellipticin (Obr. 32 D na straně 57)



Obrázek 33 Vliv vandetanibu, lenvatinibu a cabozantinibu na oxidaci ellipticinu cyklooxygenasou 1. Data získána z experimentu, kde reakční směs obsahovala hematin jsou označená šedě. Data získána z experimentu, kde reakční směs byla prostá hematinu jsou označená zelenou barvou. Uvedená data jsou průměry a standardní odchylky ze tří experimentů. Data byla analyzována za pomoci Studentova t-testu, *** $P < 0,001$; ** $P < 0,01$; * $P < 0,05$

4.5. Vlivu vandetanibu, lenvatinibu a cabozantinibu na oxidaci elliptycinu thyreoperoxidasou

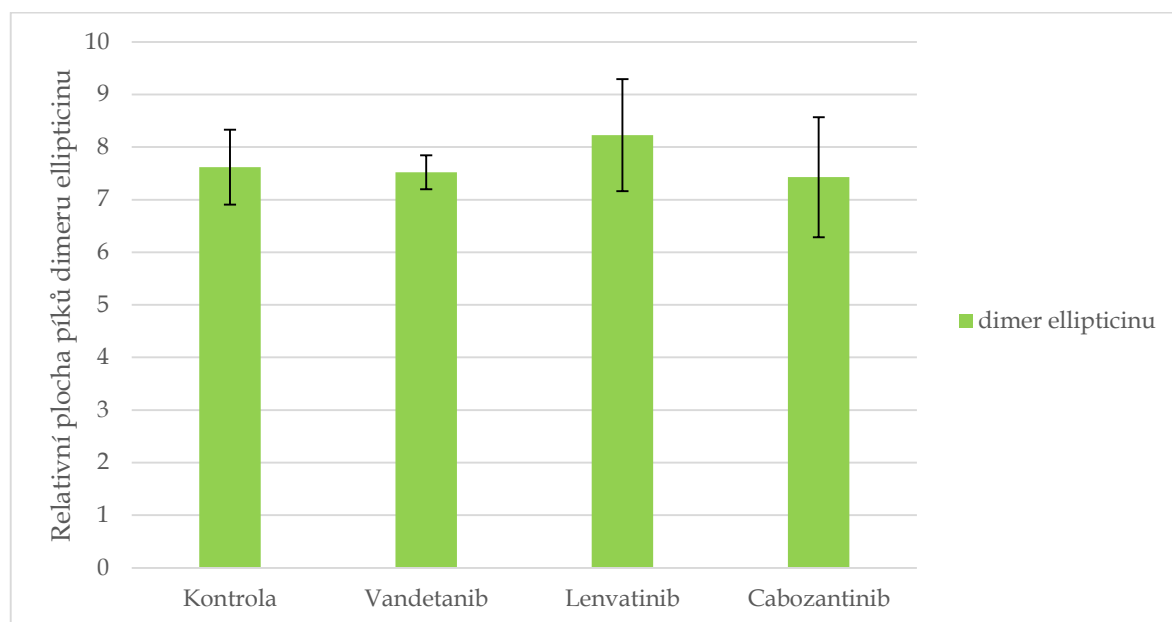
Na základě znalosti, že peroxidasy oxidují ellipticin [Stiborová a kol. 2007] a z důvodu, že literatura neuvádí, zda je ellipticin oxidován i thyreoperoxidasou, bylo testováno, zda ke kalalýze oxidace elliptycinu tímto enzymem dochází. Thyreoperoxidasa je enzym, které se ve štítné žláze podílí na syntéze thyroidních hormonů [Taurog a kol. 1996]. Výsledky uvedené na obrázku 34 A a B kde jsou zaznamenány průběhy separace produktů oxidace elliptycinu thyreoperoxidasou signalizují, že thyreoperoxidasa je v oxidaci elliptycinu aktivní.



Obrázek 34. HPLC produktů oxidace elliptycinu v reakční směsi obsahující ellipticin, thyreoperoxidasu a peroxid vodíku (A), za nepřítomnosti thyreoperoxidasy nebo peroxidu vodíku (B). Reakční směs obsahovala 10 μ M elliptycinu, 25 μ M peroxidu vodíku a 2 μ g thyreoperoxidasy. Separace probíhala na koloně s C18 nosičem zrnitosti 5 μ m o rozměrech 4,6 \times 250 mm ULTRASPHERE. Detekce 296 nm, 37°C, rychlost průtoku mobilní fáze 0,8 ml/min gradient metanolu od 45-90% v 10 mM octanu amonného pH = 2,8.

Prezentované výsledky jsou unikátní z pohledu, že schopnost lidské thyreoperoxidasy v přítomnosti peroxidu vodíku oxidovat ellipticin na jeho metabolit, dimer ellipticinu, nebyla v literatuře doposud popsána (Obr. 34 A na straně 59). Peroxid vodíku, respektive samotná thyreoperoxidasa ellipticin neoxidují (Obr. 34 B na straně 59)

Vliv vandetanibu, lenvatinibu a cabozantinibu na oxidaci ellipticinu thyreoperoxidasou je uveden na obrázku 35. Z výsledků uvedených na tomto obrázku je patrné, že testované inhibitory tyrosinkinas oxidaci ellipticinu thyreoperoxidasou neovlivňují.



Obrázek 35 Vliv vandetanibu, lenvatinibu a cabozantinibu na oxidaci ellipticinu thyreoperoxidasou. Uvedená data jsou průměry a standardní odchylky tří hodnot. Data byla analyzována za pomoci Studentova t-testu, *** $P < 0,001$; ** $P < 0,01$; * $P < 0,05$,

Část výsledků uvedených v předložené bakalářské práci je součástí publikace Kolárik M., Indra R., Adam V., Heger Z., Kopečková K., Arlt V. M., Stiborová M. (2018) Tyrosine kinase inhibitors vandetanib, lenvatinib and cabozantinib modulate oxidation of an anticancer agent ellipticine catalyzed by cytochromes P450 *in vitro*. *Neuroendocrinology Letters* 39 (7) : 515 – 524

5. Diskuze

Léčba nádorových onemocnění je i přes celosvětově vysoké usilí, stále poměrně málo úspěšná, než by bylo pro lidskou populaci potřebné. Stále jsou proto hledány nové přístupy, které by vedly k úspěšnější léčbě. Jedním z přístupů, které jsou v posledních letech stále více a více studovány je použití chemoterapie léčiv v jejich kombinacích. Navíc je důležité použití takových léčiv, které mají relativně nízké vedlejší účinky, či léčiv cílených na nádorovou tkáň s nízkým vlivem na zdravé buňky.

Předkládaná bakalářská práce se zabývá studiem farmak účinných v léčbě nádorů štítné žlázy, konkrétně dvěma typy takových léčiv. Jedním z nich je protinádorové léčivo ellipticin, účinné vůči anaplastickému typu nádoru štítné žlázy [Juret a kol. 1979]. Dále je to skupina nově schválených léčiv efektivních vůči papilárnímu karcinomu štítné žlázy i medulárnímu karcinomu tohoto orgánu. Konkrétně vandetanibu a cabozantinibu (účinkují vůči medulárním nádorům štítné žlázy) a lenvatinibu (používanému k léčbě papilárního karcinomu štítné žlázy) [Wells a kol. 2012], [Fallahi a kol. 2015] a [Cabanillas a kol. 2015].

Bakalářská práce se konkrétně zabývá studiem možného ovlivnění účinnosti těchto léčiv, jsou-li podávány v kombinacích. Pro účinek léčiv je důležité poznat, jak jsou v organismu přeměňovány, jak ovlivňují svůj metabolismus navzájem a jak je ovlivněn mechanismus jejich účinku, jsou-li podávány v kombinacích.

Studovaná protinádorová léčiva působí rozdílnými mechanismem účinku. Ellipticin způsobuje v nádorových buňkách poškození DNA, díky interkalačním účinkům na DNA [Stiborová & Frei 2001], působí také jako inhibitor topoisomerasy II [Monnot a kol. 1991] a kovalentně modifikuje DNA tvorbou aduktů DNA. Konkrétně adukty tvořené reaktivními (aktivačními) metabolity či jejich produkty, 13-hydroxy-, 12-hydroxyellipticinu a N^2 -oxid ellipticinu [Stiborová a kol. 2006]. Naproti tomu vandetanib, lenvatinib a cabozantinib působí jako inhibitory tyrosinkinas, cílících přes buněčné receptory na iniciaci apoptosy [Arora & Scholar 2005]. Všechna studovaná léčiva jsou navíc z hlediska efektivity ovlivněna jejich vlastním metabolismem v organismu [Martin a kol. 2012] [Tamai a kol. 2017] a [Lacy a kol. 2015]. V práci byl použit přístup sledování metabolismu ellipticinu, který byl v literatuře detailně popsán [Stiborová a kol. 2006], studovanými inhibitory tyrosinkinas, vandetanibem, lenvatinibem a cabozantinibem. Tento typ přístupu byl zvolen také proto, že i když metabolismus studovaných inhibitorů tyrosinkinas není ještě plně detailně

prozkoumán, jejich působením na metabolismus ellipticinu nás informuje o možných změnách ve farmakologické účinnosti ellipticinu.

V experimentech studujících metabolismus ellipticinu bylo užito několika typů biotransformačních enzymových systémů. Vzhledem k tomu, že je ellipticin oxidován cytochromy P450, ke studiu byly použity mikrosomální systémy člověka a modelového organismu laboratorního potkana. V těchto jaterních systémech je totiž bohatě zastoupený enzymový systém oxidas se smíšenou funkcí, obsahující cytochrom P450 jako terminální oxidasu [Coleman 2010]. Vedle mikrosomů byly použity též vybrané cytochromy P450 připravené ve formě preparátů Superomů™ (získané z komerčních zdrojů), obsahujících vždy pouze jediný cytochrom P450. Studováno bylo i ovlivnění metabolismu ellipticinu peroxidasami, které jsou v metabolismu ellipticinu také účinné. V případě systému cytochromů P450 i peroxidas bylo sledováno, jak inhibitory tyrosinkinas ovlivňují tvorbu jak detoxifikačních, tak i aktivačních metabolitů, které diktuji farmakologickou účinnost ellipticinu [Poljaková a kol. 2005] a [Stiborová a kol. 2006].

Studované inhibitory tyrosinkinas modulují metabolismus ellipticinu cytochromy P450 rozdílně. Výsledky lze stručně zobecnit tak, že testované látky inhibují oxidační aktivaci ellipticinu katalyzovanou enzymy mikrosomálního systému člověka a potkana, konkrétně cytochromy P450 2D6 a 3A4 *in vitro*. Inhibice reakce oxidace ellipticinu katalyzované CYP2D6 ale není obecnou skutečností, neboť sledovanými inhibitory tyrosinkinas není inhibována reakce „markerového“ substrátu tohoto enzymu, bufuralolu. Naopak „markerová“ reakce katalyzovaná CYP3A4, 6β-hydroxylace testosteronu je inhibitory tyrosinkinas inhibována. Mohou tedy snižovat farmakologickou účinnost ellipticinu snížením tvorby aduktů s DNA. Detoxifikační metabolismus ellipticinu katalyzovaný CYP1A1 a 1A2 není sledovanými inhibitory tyrosinkinas ovlivněn [výsledky bakalářské práce & Kolárik a kol. 2018]. Totéž lze konstatovat i z hlediska ovlivnění oxidace ellipticinu peroxidasami (křenovou peroxidasou, laktoperoxidasou, myeloperoxidasou, cyklooxygenasou I a thyreoperoxidasou). Ty tvoří z ellipticinu dimer této sloučeniny, který je rovněž detoxifikačním produktem. Za aktivaci ellipticinu je zodpovědná tvorba N^2 -oxidu ellipticinu, který je za určitých podmínek peroxidasami také generován. i když ve velmi malém množství [Stiborová a kol. 2007]. V předložené bakalářské práci tvorba tohoto minoritního metabolitu nebyla analyzována. Tyto enzymy tedy mohou metabolicky aktivovat ellipticin i v cílovém orgánu, štítné žláze nebo v nádorech

tohoto orgánu. Tento předpoklad je podporován i výsledky studia vlivu elliptycinu na buněčné kultury nádorů štítné žlázy v práci [Poljaková a kol. 2013]. Bylo zjištěno že ellipticin je vůči těmto nádorovým buňkám účinný (cytotoxický a genotoxický), kde jeho genotoxicita odpovídá tvorbě kovalentních aduktů s DNA. Ty jsou tvořeny při oxidaci elliptycinu na ellipticin-13-ylidium tvořeného z methyliminu elliptycinu (Obr. 4 na straně 19) a ellipticin-12-ylidium generovaného z N^2 -oxidu elliptycinu [Stiborová a kol. 2007], [Poljaková a kol. 2013].

V budoucnosti předpokládáme studium ovlivnění metabolismu testovaných inhibitorů tyrosinkinas ellipticinem. Tedy poznání jak může být jejich farmakologický účinek ovlivněn ellipticinem. K tomu je však třeba detailně prostudovat jejich metabolismu a poznat enzymy, které tyto reakce katalyzují. Tato oblast je v současné době v laboratoři, kde byla bakalářská práce vypracována, intenzivně studována.

6. Závěr

Předkládaná bakalářská práce je příspěvkem k poznání vlivu inhibitorů tyrosinkinas vandetanibu, lenvatinibu a cabozantinibu na metabolismus ellipticinu *in vitro*.

- ❖ Inhibitory tyrosinkinas vandetanib, lenvatinib a cabozantinib inhibují oxidaci ellipticinu enzymovými systémy mikrosomů člověka a potkana obsahujících cytochromy P450.
- ❖ Detoxifikační metabolismus ellipticinu cytochromy P450 za tvorby 9-hydroxy- a 7-hydroxyellipticinu není modulován vandetanibem, lenvatinibem a cabozantinibem. Na druhé straně generace aktivačních metabolitů ellipticinu (12-hydroxy-, 13-hydroxyellipticinu a N^2 -oxidu ellipticinu), a to zejména cytochromy P450 2D6 a 3A4, je ovlivněna (snížena) inhibitory tyrosinkinas. Tato skutečnost může vést ke snížení farmakologické účinnosti ellipticinu.
- ❖ Inhibitory tyrosinkinas, vandetanib, lenvatinib a cabozantinib neinhibují oxidaci bufuralolu katalyzovanou cytochromem P450 2D6, na druhé straně byl inhibiční účinek těchto sloučenin zjištěn na oxidaci diklofenaku, katalyzovanou CYP2C9 a 6 β -hydroxylaci testosteronu, katalyzovanou CYP3A4.
- ❖ Tvorba dimeru ellipticinu katalyzována křenovou peroxidasou, laktoperoxidasou, myeloperoxidasou a cyklooxygenasou-1 prakticky nebyla studovanými inhibitory tyrosinkinas, vandetanibem, lenvatinibem a cabozantinibem ovlivněna.
- ❖ Originálně bylo zjištěno, že ellipticin je oxidován na dimer ellipticinu také thyreoperoxidasou. Analogicky s touto reakcí, katalyzovanou jinými peroxidasami (křenovou peroxidasou, laktoperoxidasou, myeloperoxidasou a cyklooxygenasou-1), nebyla tato reakce ovlivněna studovanými inhibitory tyrosinkinas.

7. Použitá literatura

1. Abdelaziz A., Vaishamayan U. (2017) Cabozantinib for the treatment of kidney cancer *Expert Review of Anticancer Therapy* 17 (7): 577-584
2. Arlt V. M., Henderson C. J., Wolf C. R., Schmeiser H. H., Phillips D. H., Stiborová M. (2004) Bioactivation of 3-aminobenzanthrone, a human metabolite of environmental pollutant 3-nitrobenzanthrone: evidence for DNA adduct formation mediated by cytochrome P450 enzymes and peroxidases. *Cancer Letters* 234: 220-231
3. Arora A. & Scholar E. M. (2005) Role of tyrosin kinase inhibitors in cancer therapy. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 315: 971-979
4. Auclair C. (1987) Multimodal action of antitumor agent on DNA: The ellipticine series. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 259 (1): 1-14
5. Bořek-Dohalská L. (2002) Study of cytochromes P450 and their participation and oxidation of anticancer drug ellipticine. *Disertační práce, katedra biochemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova*
6. Brian W. R., Sari M. A., Iwasaki M., Shimada T., Kaminsky L. S., Guengerich F. P. (1990) Catalytic activities of human liver cytochrome P-450 IIIA4 expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry* 29: 11280-11292
7. Cabanillas M.E., Schlumberger M., Jarzab B., Martins R.G., Pacini F., Robinson B., McCaffrey J.C., Shah M.H., Bodenner D.L., Topliss D., Andresen C., O'Brien J.P., Ren M., Funahashi Y., Allison R., Elisei R., Newbold K., Licitra L.F., Sherman S.I., Ball D.W. (2015) A phase 2 trial of lenvatinib (E7080) in advanced, progressive, radioiodine – refractory differentiated thyroid cancer: a clinical outcomes and biomarker assessment. *Cancer* 121, 2749-2756
8. Coleman M. D. (2010) Human drug metabolism: An introduction. *Wiley-Blackwell*, druhé vydání

9. Deeks E. D. (2019) Cabozantinib: a review in advanced hepatocellular carcinoma. *Target Oncology* 14 (1): 107-113
10. Fallahi P., Ferrari S. M., Di Bari F., Materazzi G., Benvenga S., Miccoli P., Antonelli A. (2015) Cabozantinib in thyroid cancer. *Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery* 10: 259-269
11. Goodwin S., Smith A. F., Horning E. C. (1959) Alkaloids of *Ochrosia elliptica*, Labil. *Journal of American Chemical Society* 81 (8): 1903-1908
12. Gotink K. J., Verhuel H. M. V. (2010) Anti-angiogenic tyrosine kinase inhibitors: what is their mechanism of action? *Angiogenesis* 13: 1-14
13. Herbst R. S., Heymach J. V., O'Reilly M. S., Onn A., Ryan A. J. (2007) Vandetanib (ZD6474): an orally available receptor tyrosine kinase inhibitor that selectively targets pathways critical for tumor growth and angiogenesis. *Expert Opinion on Investigational Drugs* 16(2): 239-249
14. Hussein Z., Mizuo H., Hayato S., Namiki M., Shumaker R. (2017) Clinical pharmacokinetic and pharmacodynamic profile of lenvatinib, *European Journal Drug Metabolism and Pharmacokinetics* 42, 903-914
15. Inoue K., Mizuo H., Kawaguchi S., Fukuda K., Kusano K., Yoshimura T. (2014) Oxidative metabolism of lenvatinib by aldehyde oxidase. *Drug Metabolism and Disposition* 43: 1326-1333
16. Juret P., Tanguy A., Girard A., Le Talaer J. Y., Abatucci J. S., Dat-Xuong N., Le Pecq J. B., Paoletti C. (1979) Hydroxy 9-methyl 2-ellipticinium acetate (NCS 246-137). Toxicology study and therapeutic effect in 100 cancers. *La Nouvelle Presse Medicale* 8 (18): 1495-1498
17. Kaphalia L., Kaphalia B. S., Kumar S., Kanz M. F., Treinen-Moslen M. (2006) Efficient high performance liquid chromatograph/ultraviolet method for determination of diclofenac and 4'-hydroxydiclofenac in rat serum. *Journal of Chromatography. B* 830, 231–237.

18. Kolárik M., Indra R., Adam V., Heger Z., Kopečková K., Arlt V. M., Stiborová M. (2018) Tyrosine kinase inhibitors vandetanib, lenvatinib and cabozantinib modulate oxidation of an anticancer agent ellipticine catalyzed by cytochromes P450, *Neuroendocrinology Letters* 39 (7): 515-524
19. Kotrbová V., Mrázová B., Moserová M., Martínek V., Hodek P., Hudeček J., Frei E., Stiborová M. (2011) Cytochrome *b₅* shifts oxidation of the anticancer drug ellipticine by cytochromes P450 1A1 and 1A2 from its detoxication to activation thereby modulating its pharmacological efficacy. *Biochemical Pharmacology* 82: 669-680
20. Kumarasami V. M. & Sun D. (2017) Demonstration of potent RET transcriptional inhibitor for the treatment of medullary thyroid carcinoma based on an ellipticine derivate. *International Journal of Oncology* 51: 145-157
21. Kussendrager K. D. & van Hooijdonk A. C. M. (2000) Lactoperoxidase: physico-chemical properties occurrence, mechanism of action and applications. *British Journal of Nutrition* 84 (1): S19-S25
22. Lacy S., Hsu B., Miles D., Aftab D., Wang R., Nguyen L. (2015) Metabolism and disposition of cabozantinib in healthy male volunteers and pharmacological characterisation of its major metabolites. *Drug Metabolism and Disposition* 43: 1190-1207
23. Martin P., Oliver S., Robertson J., Kennedy S. J., Read J., Duvauchelle T. (2011) Pharmacokinetic drug interactions with vandetanib during coadministration with rifampicin or itraconazole. *Drugs in R & D*, 11: 37-51
24. Martin P., Oliver S. Kennedy S. J., Partridge E., Hutchinson M., Clarke D., Giles P. (2012) Pharmacokinetics of vandetanib: three phase I studies in healthy subjects. *Clinical Therapeutics* 34: 221-237

25. Monnot M., Mauffret O., Simon V., Lescot L., Psaume B., Saucier J. M., Charra M., Belehraddek J. Jr., Fermandjian S. (1991) DNA-drug recognition and effect on topoisomerase II mediated toxicity. A three-mode binding model for ellipticine derivates. *Journal of Biological Chemistry* 266 (3): 1820-1829
26. Morita I. (2002) Distinct functions of COX-1 and COX-2. *Prostaglandins & other Lipid Mediators* 68–69: 165–175
27. Paoletti C., Le Pecq J. B., Dat-Xuong N., Juret P., Garnier H., Amiel J. L., Rouesse J. (1980) Antitumor activity, pharmacology, and toxicity of ellipticines, ellipticinium and 9-hydroxyderivates: preliminary clinical trials of 2-methyl-9-hydroxy ellipticinium (NSC 264-137) *Recent Results in Cancer Research* 74: 107-123
28. Personeni N., Pressiani T., Rimassa L. (2019) Lenvatinib for the treatment of unresectable hepatocellular carcinoma: evidence to date. *Journal of Hepatocellular Carcinoma* 6: 31-39
29. Poljaková J., Forsterová K., Šulc M., Frei E., Stiborová M. (2005) Oxidation of an antitumor drug ellipticine by peroxidases. *Biomedical Papers, Medical Faculty University Palacky Olomouc Czech Republic* 149: 449-453.
30. Poljaková J., Eckschlager T., Činátl J., Kizek R., Frei E., Stiborová M. (2013) Electrochemical determination of enzymes metabolizing ellipticine in thyroid cancer cells - a tool to explain the mechanism of ellipticine toxicity to these cells. *International Journal of Electrochemical Science* 8: 1573-1585
31. Rendic S. & Di Carlo F., (1997) Human cytochrome P450 enzymes: a status report summarizing their reactions, substrates, inducers and inhibitors. *Drug Metabolism Reviews* 29(1&2): 413-580
32. Roviello G., Corona S. P., Bozza G., Aieta M., Generali D., Rodriquenz M. G., Mileo A. M., Imperatori M., Ianza A., Conca R., Sobhani N. (2018) Lenvatinib for the

treatment of renal cell carcinoma. *Expert Opinion in Investigation of Drugs* 27: 507-512

33. Omura T., Sato R. (1964) The carbon monoxide – binding pigment of liver microsomes. *Journal of Biological Chemistry* 239: 2370-2378
34. Singh M. P., Hill G. C., Peoc'h D., Rayner B., Imbach J. L., Lown J. W. (1994) High-field NMR and restrained molecular modeling studies on a DNA heteroduplex containing a modified apurinic abasic site in the form of covalently linked 9-aminoellipticine. *Biochemistry* 33: 10271-10285
35. Skálová L., Boušová I., Machala M., Pávek P., Podlipná R., Souček P., Szotáková B., Vondráček J., Wsól V. (2011) Metabolismus léčiv a jiných xenobiotik. Učební text Univerzity Karlovy, *Karolinum*
36. Stiborová M., Hudeček J., Hodek P., Frei E. (1999) Význam cytochromů P450 pro lidské zdraví, *Chemické listy* 93: 229-237
37. Stiborová M., Mikšanová M., Martínek V., Frei E. (2000) Heme peroxidases: structure, function, mechanism and involvement in activation of carcinogens. A review. *Collection of Czechoslovak Chemical Communication* 65 (3): 297-325
38. Stiborová M., Bieler C. A., Wiessler M., Frei E. (2001) The anticancer agent ellipticine on activation by cytochrome P450 forms covalent DNA adducts. *Biochemical Pharmacology* 62: 1675-1684.
39. Stiborová M. & Frei E. (2001) Deriváty ellipticinu s cíleným protinádorovým účinkem. *Chemické Listy* 95: 549-555
40. Stiborová M., Mikšanová M., Havlíček V., Schmeiser H. H., Frei E., (2002) Mechanism of peroxidase mediated oxidation of carcinogenic *o*-anisidine and its binding to DNA, *Mutation Research*, 500: 49-66

41. Stiborová M., Hudeček J., Páca J. Jr., Martínek V., Páca J. (2004 a) Enzymy metabolizující kontaminanty životního prostředí. *Chemické Listy* 98: 876-890
42. Stiborová M., Forsterová K., Rupertová M., Wiesner J., Hudeček J., Wiessler M., Frei E. (2004 b) The anticancer drug ellipticine forms covalent DNA adducts, mediated by human cytochromes P450, through metabolism to 13-hydroxyellipticine and ellipticine N^2 -oxide. *Cancer Res* 64: 8374–8380.
43. Stiborová M., Martínek V., Rýdlová H., Koblas T., Hodek P. (2005) Expression of cytochrome P450 1A1 and its contribution to oxidation of a potential human carcinogen 1-phenylazo-2-naphthol (Sudan I) in human livers. *Cancer Letters* 220 (2): 145-154
44. Stiborová M., Bořek-Dohalská L., Aimová D., Kotrbová V., Kukačková K., Janouchová K., Rupertová M., Ryšlavá H., Hudeček J., Frei E. (2006) Oxidation pattern of the anticancer drug ellipticine by hepatic microsomes – Similarity between human and rat systems. *General Physiology and Biophysics* 25 : 245-261
45. Stiborová M., Poljaková J., Ryšlavá H., Dračinsky M., Eckschlager T. a Frei E. (2007) Mammalian peroxidases activate anticancer drug ellipticine to intermediates forming deoxyguanosine adducts in DNA identical to those found *in vivo* and generated from 12-hydroxyellipticine and 13-hydroxyellipticine. *International Journal of Cancer* 120: 243-251.
46. Stiborova M. & Frei E. (2014) Ellipticines as DNA-targeted chemotherapeutics. *Current Medicinal Chemistry* 21: 575-591
47. Stiborová M., Indra R., Moserová M., Frei E., Schmeiser H. H., Kopka K., Phillips D. H., Arlt V. M. (2016) NADH:cytochrome b_5 reductase and cytochrome b_5 can act as sole electron donors to human cytochrome P450 1A1-mediated oxidation and

DNA adduct formation by benzo[a]pyrene, *Chemical Research in Toxicology* 29 : 1325-1334

48. Sugikawa E., Hosoi T., Yazaki N., Gamaznuma N., Nakanishi N., Ohashi M. (1999) Mutant p53 mediated introduction of cell cycle arrest and apoptosis at G1 phase by 9-hydroxyellipticine. *Anticancer Research* 19 (4B): 3099-3108
49. Tamai T., Hayato S., Hojo S., Suzuki T., Okusaka T., Ikeda K., Kumada H. (2017) Dose finding of lenvatinib in subjects with advanced hepatocellular carcinoma based on population pharmacokinetic and exposure-response analyses, *Journal of Clinical Pharmacology* 57, 1138-1147
50. Taurog A., Dorris M. L., Doerge D. R. (1996) Mechanism of simultaneous iodination and coupling catalysed by thyroid peroxidase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 330 (1): 24-32
51. Transon C., Leemann T. & Dayer P. (1996) *In vitro* comparative inhibition profiles of major drug metabolising cytochrome P450 isoenzymes (CYP2C9, CYP2D6 and CYP3A4) by HMG-CoA reductase inhibitors. *European Journal of Clinical Pharmacology*. 50: 209-215
52. Vavrová K. (2018) Metabolismus inhibitoru tyrosinkinas lenvatinibu jako protinádorového léčiva s cílenými účinky. *Diplomová práce, katedra biochemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova*
53. Veitch N. C. (2004) Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme. *Phytochemistry* 65: 249-259
54. Wells S. A., Robinson B. G., Gagel R. F., Dralle H., Fagin J. A., Santoro M., Baudin E., Elisei R., Jerzab B., Vasselli J. R., Read J., Langmuir P., Ryan A. J., Schlumberg M. J. (2012) Vandetanib in patients with locally advanced or metastatic medullary thyroid cancer: a randomized, double-blind phase III trial. *J. Clin. Oncology* 30 (2) : 134-141

55. Yakes M. F., Chen J., Tan J., Yamaguchi K., Shi Y., Yu P., Qian F., Chu F., Bentzien F., Cancilla B., Ofri J., You A., Laird D. A., Engst S., Lee L., Lecch J., Chou Y., Joly A. H. (2011) Cabozantinib (XL184), a novel MET and VEGFR2 inhibitor, simultaneously suppresses metastasis, angiogenesis, and tumor growth. *Molecular Cancer Therapeutics* 10 (12): 2298-2308
56. Yamazaki H., Guo Z., Persmark M., Mimura M., Inoue K., Guengerich F. P., Shimada T. (1994) Bufuralol hydroxylation by cytochromes P450 2D6 and 1A2 enzymes in human liver microsomes. *Molecular Pharmacology* 46: 568-577

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovatelů.

[illegible]